

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E FISIOLÓGICO LONGITUDINAL DO PARASITISMO GASTRO-  
INTESTINAL NUMA POPULAÇÃO DE COELHO BRAVO NO RIBATEJO

ISABEL MARIA BARAHONA SIMÕES DE ABREU

ORIENTADOR:  
Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Carço dos  
Santos  
COORIENTADOR:  
Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2019



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E FISIOLÓGICO LONGITUDINAL DO PARASITISMO GASTRO-  
INTESTINAL NUMA POPULAÇÃO DE COELHO BRAVO NO RIBATEJO

DISSERTAÇÃO DE Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

ISABEL MARIA BARAHONA SIMÕES DE ABREU

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Virgílio da Silva Almeida

VOGAIS:

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro  
de Oliveira

Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Carço dos  
Santos

ORIENTADOR:

Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Carço dos  
Santos

COORIENTADOR:

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

### Anexo 3 – DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Isabel Maria Barahona Simões de Abreu

Título da Tese ou Dissertação: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E FISIOLÓGICO LONGITUDINAL DO PARASITISMO GASTRO-INTESTINAL NUMA POPULAÇÃO DE COELHO BRAVO NO RIBATEJO

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas):

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

Clínica

Produção Animal e Segurança Alimentar

Morfologia e Função

Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Resultados obtidos no âmbito de um projecto de investigação, que ainda não foram publicados em revista científica com revisão por pares. A publicação em revista científica com revisão por pares deverá ocorrer em 2020, pelo que se solicita a não disponibilização mundial da tese durante 12 meses.

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: \_\_\_\_\_

*“Esta vida é para se fazer valer”  
-Eurico, o Charmoso*

## **Agradecimentos**

Ao Nuno Santos, por me ter acompanhado neste projeto final, por me ter ensinado a ser investigadora científica, e por me ter aturado na minha energia social matinal e gulas de pastelaria - obrigada pela tutelação.

Ao professor Luís Madeira de Carvalho, que tem sempre um assunto interessante para discutir, que me abriu várias portas desde o início, e me permitiu seguir o percurso que queria. Obrigada pelo estímulo académico.

À Dra. Lídia Gomes, Santa Padroeira dos ignóbeis alunos em laboratório de parasitologia, pela infundável paciência e assistência técnica.

Todo este percurso académico foi acompanhado pela minha família, que sempre soube motivar-me.

Em particular a Marta, que sabe sempre exatamente o que preciso de ouvir. O Nuno e a Luísa, omnipresentes. A minha Mãe, pelos carinhos e lanches para “arejar a cabeça”. O meu Pai, sempre a uma chamada de distância, que nunca me deixou desistir. E os primos e as tias, que quero que saibam que me mantiveram com os pés na terra.

Aos meus padrinhos, Nucha e João, guias de percurso académico e pessoal, eternos apoiantes do desenvolvimento individual, como sempre, obrigada.

Aos meus amigos, aqueles longe e aqueles perto, que tiveram sempre um espacinho para mim, para as minhas frustrações e as minhas dúvidas, obrigada pela paciência e companhia.

Em especial à Patrícia Lopes, a Magnânime, Marco Saavedra, o Sensato, Catarina Rato, a Fiel.

Ao Gustavo, o meu porto seguro, a minha casa, a quem pude sempre voltar (-me), obrigada por me ajudares a voar.

## Resumo

O coelho-bravo é endêmico da Península Ibérica, onde a sua importância como engenheiro de ecossistemas e espécie-chave está largamente descrita, incluindo um papel central como presa de espécies ameaçadas como o Lince Ibérico (*Lynx pardinus*) e a Águia Imperial (*Aquila adalbertii*). O declínio da sua população tem vindo a ser notado nas últimas décadas, com diversas causas estudadas, incluindo a perda de habitat, doenças virais altamente contagiosas, como a Mixomatose e a Doença Hemorrágica Viral, bem como as parasitoses gastrointestinais e a caça excessiva. É, por isso, importante monitorizar as suas populações, para restabelecer o equilíbrio ecológico. O presente estudo foi realizado na Companhia das Lezírias, S.A., no Ribatejo, onde foram colocadas 53 armadilhas Tomahawk™. Entre maio de 2018 e maio de 2019 foram realizadas campanhas de 4 ou 5 dias, com 4 a 6 semanas de intervalo, nas quais as armadilhas eram sequencialmente, ativadas, vistoriadas e desativadas, em 3 turnos por dia. Os coelhos capturados foram submetidos a várias colheitas de amostras biológicas e biometrias, e registados a faixa etária, o sexo e o estado reprodutivo. A partir do sangue colhido em EDTA foi determinado o hemograma. As fezes presentes no solo por debaixo da armadilha onde ocorreu a captura foram colhidas, refrigeradas e analisadas no laboratório de Parasitologia da FMV- ULisboa, através dos métodos de flutuação de Willis, sedimentação e McMaster. Observou-se uma prevalência de parasitismo global elevada (70,3% IC<sub>95</sub> 60,8-78,3%), mais baixa do que o esperado para strongilídeos (31,0% (IC<sub>95</sub> 22,8 – 40,6)). A prevalência parasitária foi máxima em maio (92,9% IC<sub>95</sub> 68,5-98,7%) e mínima em agosto (57,7% IC<sub>95</sub> 39-74,5%), e consistentemente mais elevada em fêmeas (75,8% IC<sub>95</sub> 65,9-84,8%) e adultos (72,9% IC<sub>95</sub> 62,7-81,2%). Contrariamente, a eliminação de oocistos e ovos foi mais elevada em machos (6725 ± 9146,4 OoPG/OPG) e juvenis (21641,7 ± 33870 OoPG/OPG). O grupo parasitário mais prevalente foi o das coccídias de *Eimeria* sp. (47,5% IC<sub>95</sub> 38,1-57,2%). As eliminações de ovos e oocistos foram notavelmente mais altas entre maio e julho, minimizando-se em agosto, como previsto para meses mais secos. As contagens de eritrócitos foram significativamente mais elevadas nos meses de julho e agosto de 2018, os meses mais secos e quentes deste estudo. A limitação do estudo terá sido a pequena amostra obtida nos meses de outono e inverno, pelo que a sua continuação a longo prazo deve permitir apurar a influência do parasitismo na mortalidade das populações de coelho-bravo, e possivelmente estabelecer uma curva de parâmetros demográficos que permitirão gerir melhor as populações desta espécie e com isso recuperar o equilíbrio dos ecossistemas.

Palavras-chave: *Oryctolagus cuniculus algirus*, parasitas gastrointestinais, hematologia, medicina da conservação, Ribatejo, Portugal.

## Abstract

The wild rabbit is endemic to the Iberian Peninsula, where its role as an ecosystem engineer and key-species has been widely described. We now know of its influence on every trophic level, including in the conservation of the Iberian Lynx (*Lynx pardinus*) and Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalbertii*), to which it remains the preferred prey. Its decline has been noticed over the course of the last few decades, with numerous studies attempting to relate it to several factors, having found that the main reasons are habitat depletion, fatal viral diseases, like Myxomatosis and Rabbit Haemorrhagic Viral Disease, as well as gastrointestinal parasitic diseases and excessive hunting. As such, it is a priority to monitor its demography, to re-establish ecological balance. The present study was carried out in Companhia das Lezírias, S.A., located in Ribatejo, Portugal, where 53 Tomahawk™ traps were placed. Between May 2018 and May 2019, 4-5-day campaigns were performed, every 4 to 6 weeks, in which the traps were sequentially activated, verified and deactivated, in three shifts throughout the day. The captured rabbits were systematically submitted to biological sample and biometric data collection, and their age class, sex and reproductive state registered. The hemogram was determined from whole blood collected in EDTA. Rabbit faeces detected on the soil underneath the successful trap were collected, refrigerated, and later processed in the Parasitology Laboratory at FMV-ULisboa, using McMaster, flotation and sedimentation methods. It was possible to observe an elevated overall prevalence of gastrointestinal parasites (70,3% IC<sub>95</sub> 60,8-78,3%), lower than expected for strongylids (31,0% (IC<sub>95</sub> 22,8 – 40,6)). Global prevalence reached higher values in May (92,9% IC<sub>95</sub> 68,5-98,7%) and lower in August (57,7% IC<sub>95</sub> 39-74,5%), and was consistently higher in females (75,8% IC<sub>95</sub> 65,9-84,8%) and adults (72,9% IC<sub>95</sub> 62,7-81,2%). The most prevalent parasite group was the coccidian of *Eimeria* sp. (47,5% IC<sub>95</sub> 38,1-57,2%). The highest EPG's were observed between May and July, and the lowest in August, as predicted for drier months. Contrary to the prevalence, EPG was higher in males (6725 ± 9146,4 OoPG/OPG) and juvenile rabbits (21641,7 ± 33870 OoPG/OPG). The erythrocyte count was significantly higher in July and August, the hottest and driest months of this study. Since the main limiting factor in this study's success was the low amount of samples obtained in the autumn and winter, its long-term pursuit should allow for a better understanding of the influence of parasitic diseases in wild rabbit susceptibility and life expectancy, as well as defining a demographic curve that will enable better management of their populations, thus recovering the balance of the ecosystems.

Keywords: *Oryctolagus cuniculus algirus*, gastrointestinal parasites, haematology, conservation medicine, Ribatejo, Portugal.

## **Índice**

<b>Agradecimentos</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	iii
<b>Índice de figuras</b> .....	v
<b>Lista de Tabelas</b> .....	vi
<b>Lista de gráficos</b> .....	vii
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	viii
<b>1. Descrição das atividades realizadas durante o estágio curricular</b> .....	ix
<b>2. Introdução teórica</b> .....	1
<b>2.1. O coelho europeu</b> .....	1
2.1.1. O coelho-bravo na Península Ibérica .....	1
2.1.2. Morfologia .....	2
2.1.3. Alimentação .....	3
2.1.4. Fisiologia reprodutiva e ciclo de vida .....	4
2.1.5. Hematologia .....	6
2.1.6. Estrutura social e comportamento .....	8
2.1.7. Habitat preferencial .....	9
2.1.8. Ecologia trófica .....	10
2.1.9. Doenças infetocontagiosas .....	13
2.1.10. Medicina preventiva .....	22
<b>3. Estudo epidemiológico e fisiológico longitudinal do parasitismo gastrointestinal numa população de coelho bravo no Ribatejo</b> .....	24
<b>3.1. Objetivos do estudo</b> .....	24
<b>3.2. Material e Métodos</b> .....	24
3.2.1. Localização geográfica .....	24
3.2.3. Determinação da idade .....	29
3.2.4. Análise de amostras fecais .....	30
3.2.5. Análise Hematológica .....	31
3.2.6. Avaliação do trato gastrointestinal de cadáveres .....	33
3.2.7. Análise estatística e software .....	34
<b>3.3. Resultados e Discussão</b> .....	35
<b>3.4. Conclusão</b> .....	55
<b>4. Bibliografia</b> .....	57

## Índice de figuras

Figura 1- Representação esquemática da possível origem e distribuição das principais populações de coelho europeu.....	2
Figura 2 - O coelho-bravo, <i>O. c. algirus</i> , na Companhia das Lezírias (foto original).....	3
Figura 3 - Exemplo de um habitat de coelho-bravo, na Companhia das Lezírias.....	10
Figura 4- Mapa de Portugal continental (Google Mapas) assinalando a localização do local de estudo, a Companhia das Lezírias, SA.....	25
Figura 5 Exemplos da vegetação e solo observados na área de estudo (Fotografias originais).....	26
Figura 6 - Distribuição e abundância do coelho-bravo em 2009 (Gonçalves et al. 2014). .....	26
Figura 7 - Localização da área de estudo e distribuição das 53 armadilhas (Santos e Alves 2019).....	27
Figura 8 - Armadilha Tomahawk™ ativada e com isco, equipada com pedal-gatilho e porta de fecho rápido por ação de mola, situada a cerca de 2 metros de uma toca de coelho-bravo (Fotografias originais).....	28
Figura 9- <i>Oryctolagus cuniculus algirus</i> capturado em armadilha, a qual foi resguardada de agressões ambientais e predatórias e colocada na vertical para extração do animal (Fotografia original).....	28
Figura 10 - Estação de trabalho de análise coprológica no LPDP da FMV-ULisboa (original).....	31
Figura 11 - Ilustração dos diferentes campos da câmara de Neubauer, designados por “W” de <i>White Blood Cells</i> (leucócitos), e “R” de <i>Red Blood Cells</i> (eritrócitos) (adaptado de Absher 1973).....	32
Figura 12- Ovos e larvas de parasitas ao microscópio ótico, detetados em análise coprológica (originais).....	38
Figura 13 – Helminthes parasitas gastrointestinais observados nos tratos gastrointestinais dos cadáveres analisados <i>post-mortem</i> (originais).....	48
Figura 14- Esfregaços de sangue corado por Giemsa, em amplificação 400x (originais) .....	49

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Valores de referência, diferenciais e absolutos, para os parâmetros hematológicos do coelho doméstico ( <i>O. c. cuniculus</i> ). .....	7
Tabela 2- Proporção de sexo e classe etária dos indivíduos sujeitos a análises coprológica e hematológica. ....	29
Tabela 3- Prevalência relativa e total e intervalo de confiança de 95% e intensidade de parasitismo e desvio-padrão obtidos na análise de 101 amostras colhidas entre maio de 2018 e maio de 2019. ....	39
Tabela 4- Intensidades de excreção $\pm$ DP para o grupo das coccídias comparadas às dos restantes grupos combinados, entre sexos, faixas etárias e a população geral. ....	45
Tabela 5 - Valor médio e desvio-padrão dos vários parâmetros hematológicos quantificados no total da população analisada (Geral), e calculado separadamente para Juvenis, Adultos, Fêmeas e Machos, em paralelo com os valores de referência (Hein & Hartman 2003; Leineweber 2018) do coelho europeu doméstico. ....	50
Tabela 6 - Comparação entre os valores médios e desvio-padrão dos vários parâmetros hematológicos e entre a população na qual se detetou infecção parasitária gastrointestinal e a população na qual não foi detetada infecção parasitária gastrointestinais. ....	54

## Lista de gráficos

Gráfico 1- Quinzena de nascimento dos coelhos juvenis capturados entre maio de 2018 e maio de 2019.....	36
Gráfico 2 - Precipitação (mm) em setembro (A) e outubro (B) de 2017.....	36
Gráfico 3- Evolução da Prevalência Global (%) e IC95 de parasitas gastrointestinais entre maio e outubro de 2018.....	37
Gráfico 4- Variação da prevalência parasitária gastrointestinal para cada grupo, entre maio e outubro de 2018.....	41
Gráfico 5 - Precipitação diária, acumulada e normal, em abril (A), maio (B) e junho (C) de 2018.....	42
Gráfico 6- Prevalência (%) dos principais grupos parasitários em adultos e juvenis, comparada com a prevalência sem distinção de faixa etária (População) e sem distinção de grupo parasitário (Global).....	43
Gráfico 7- Prevalência (%) dos principais grupos parasitários em machos e fêmeas, comparada com a prevalência sem distinção de sexo (População) e sem distinção de grupo parasitário (Global).....	44
Gráfico 8 – Progressão temporal da excreção de oocistos de coccídias (escala à esquerda) e ovos de helmintes (escala à direita), entre maio e outubro de 2018. ....	46
Gráfico 9 - Dispersão de pontos relacionando a condição corporal (peso em Kg / comprimento do tarso em metros) com a taxa de excreção parasitária nas fezes.....	47
Gráfico 10 - Contagem de eritrócitos ( $\times 10^9$ ) (A), concentração de hemoglobina (g/L) (B) e hematócrito (%) (C) e respectivos desvios-padrão, entre maio e agosto de 2018. ....	52
Gráfico 11 – Variação da contagem absoluta de leucócitos ( $\times 10^9$ ) (A) e contagens diferenciais de neutrófilos (B) e linfócitos (C) (%) e respectivos desvios-padrão, entre maio e agosto de 2018. ....	53
Gráfico 12 – Variação das contagens diferenciais de eosinófilos (A), monócitos (B) e basófilos (C) (%) e respectivos desvios-padrão, entre maio e agosto.....	53

## **Lista de abreviaturas**

CIBIO – Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos

DHV – Doença Hemorrágica Viral

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

m.i – Meses de idade

OoPG - Oocistos por grama de fezes

OPG – Ovos por grama de fezes

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE – Pós-eclosão

PI – Pós-infeção

PPP – Período pré-patente

VDHV – Vírus da Doença Hemorrágica Viral

VDHV2– Estirpe 2 do Vírus da Doença Hemorrágica Viral

LPDP – Laboratórios de Parasitologia e Doenças Parasitárias

INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P.

## 1. Descrição das atividades realizadas durante o estágio curricular

Durante o estágio, foram realizadas 5 saídas de campo, com a duração de 4 ou 5 dias, para a Companhia das Lezírias, alojados na Pequena Companhia. Ali, na zona de estudo situada na Silha do Matias (Figura 6), cerca de uma hora antes do pôr-do-sol, procedia-se a uma primeira ronda do dia, na qual eram ativadas as armadilhas, colocando cenoura fresca como isco e verificando sistematicamente a função da porta. Desta forma, ao crepúsculo, período de maior atividade do coelho-bravo, as armadilhas estavam aptas para os atrair e capturar eficazmente. Na segunda ronda do dia, geralmente pelas 22h-23h, verificavam-se individualmente as armadilhas para a presença de animais. Na última ronda, uma hora após o nascer do sol, final da hora de maior atividade destes animais, era examinada novamente cada armadilha para a captura de animais, encerrando as portas daquelas que se encontravam vazias, por forma a inativá-las.

No caso de serem detetadas na primeira ou terceira rondas armadilhas contendo um coelho, as mesmas eram cobertas com mantas escuras, resguardando os animais de possíveis predadores e do stress associado à captura. Ao retornar ao carro, preparava-se um local de colheita, utilizando um tapete de espuma rígido coberto por resguardo higiénico como base na caixa aberta da *pick-up*, onde colocávamos acessíveis os diversos materiais necessários para os procedimentos a realizar de seguida.

Retornava-se então ao local de captura, equipados com um *ziploc* para colheita de fezes no solo sob a armadilha e luvas para a sua manipulação, e um saco de tecido opaco preto, onde o coelho selvagem era cuidadosamente colocado, com o mínimo de estímulos visuais, auditivos e sensitivos possível, minimizando o stress associado ao transporte para o local de colheita. No local de colheita, o procedimento iniciava-se com a leitura do *chip*, se presente, e pesagem do coelho em balança digital com um erro de 0.05g, dentro do saco, cujo peso era previamente medido e posteriormente subtraído ao valor final. De seguida, lenta e silenciosamente e reduzindo a manipulação ao mínimo, o corpo do coelho era exposto, permanecendo a cabeça do mesmo no interior do saco. Assim dava-se seguimento aos restantes passos, em sentido caudo-cranial, realizando em primeiro lugar o teste de Watson e Tyndale-Biscoe (1953) - procurando detetar a linha apofiseal do tarso característica de coelhos juvenis; medindo depois o comprimento do tarso, procedendo então à colheita com zaragatoa de amostras rectais (duas) e vaginal (uma), conservadas depois em frascos plásticos próprios. Uma das zaragatoas rectais e a zaragatoa vaginal eram posteriormente sujeitas a pesquisa de *Coxiela burnetti* por PCR no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, enquanto as zaragatoas oral e a última retal eram sujeitas a pesquisa de Vírus da Doença Hemorrágica Viral e a conjuntival a pesquisa do vírus da Mixomatose, por PCR, no Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO). Nesta fase, caso se verificasse o coelho ser adulto, verificava-

se a presença de sinais indicativos de atividade sexual, tais como testículos escrotais ou glândulas mamárias desenvolvidas, ou sinais de gestação. Era ainda na sequência destas atividades que era feita a colheita de sangue na veia safena, embora por vezes apenas após os restantes procedimentos, por forma a não impossibilitar a continuação do protocolo, caso fossem observadas manifestações de *stress* elevado. O sangue colhido era acondicionado em dois tubos: 0,25ml em tubo de EDTA, e 1-3ml em tubo de coagulação. Era então exposta a cabeça do animal, para possibilitar a colheita de amostras oronasais e conjuntivais com zaragatoas, uma de cada, as quais eram igualmente conservadas em frascos plásticos herméticos. Nesse seguimento era medido o comprimento total do corpo e da orelha, e o comprimento e largura da cabeça. No decorrer das diferentes intervenções era sistematicamente verificado o estado geral do coelho, bem como a presença de traumatismos ou lacerações. Na fase final, era feita a colheita de madeixas de pelo na região lombar, com recurso a máquina de tosquia para animais de pequeno porte, e, caso a leitura inicial não tivesse identificado um chip, era colocado um chip no animal e colhida uma pequena amostra de tecido da orelha (biópsia), procurando observar à transparência os vasos sanguíneos por forma a evitá-los. A amostra obtida desta forma era enviada para genotipagem da subespécie no CIBIO. Se por esta altura o animal ainda não demonstrasse óbvio desconforto, era ainda registado fotograficamente o aspeto do pelo do animal, recorrendo a uma escala de cores colocada adjacente ao coelho e flash para melhor qualidade de fotografia. Todas as observações e colheitas realizadas eram registadas na ficha de captura (Anexo 1). Se fossem observados sinais de *stress* acentuado no coelho capturado aquando das colheitas, principalmente manifestados por tentativas de escapatória, o procedimento era interrompido e o animal repostado no local de captura.

Terminados estes procedimentos, o coelho era novamente colocado no saco e libertado no local de captura.

Adicionalmente aos animais capturados vivos e devolvidos ao seu habitat, foram também capturados 3 cadáveres, dois dos quais em armadilhas, e um no terreno. Nestes animais, procedeu-se à necrópsia e à análise *post-mortem* do trato gastrointestinal, em separado. Realizaram-se testes virológicos, para pesquisa de Doença Hemorrágica Viral, e bacteriológicos, para bactérias anaeróbias patogénicas, no cadáver, nos Laboratórios de Virologia e de Bacteriologia e Micologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (Anexo 2), e, no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LPDP) da FMV-Ulissboa, realizou-se a necrópsia do trato gastrointestinal e a pesquisa e identificação de parasitas helmintes adultos, bem como análises coprológicas às fezes no hospedeiro, incluídas nos restantes resultados.

As amostras de sangue foram analisadas posteriormente, procedendo-se ao microhematócrito e contagem diferencial e absoluta de células ao microscópio, por vezes num

laboratório portátil no alojamento de campo, ou mais tarde nos Laboratórios de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LPDP) da FMV-ULisboa.

As fezes colhidas foram examinadas em laboratório no LPDP da FMV-ULisboa, recorrendo a diferentes técnicas coprológicas qualitativas e quantitativas: método de Willis de flutuação, método de sedimentação e McMaster. Este último permitiu quantificar a excreção de ovos e oocistos nas fezes, sendo os restantes utilizados para a identificação de espécies parasitárias gastrointestinais.

Quer as contagens celulares hematológicas, quer as contagens de ovos fecais foram realizadas em duplicado, por forma a aumentar o nível de confiança dos resultados, e registadas em folha Office Excel.

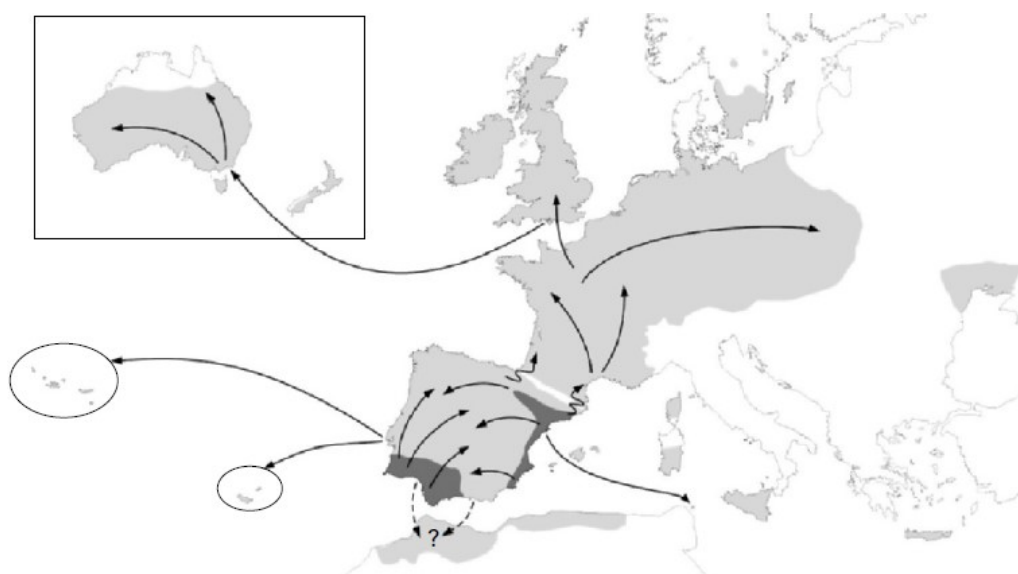
Na área onde estavam colocadas as armadilhas foram também montadas armadilhas para captura de insetos necrófagos, utilizando carne como isco, para posterior identificação e pesquisa de VDHV2 e vírus da Mixomatose.

## 2. Introdução teórica

### 2.1. O coelho europeu

#### 2.1.1. O coelho-bravo na Península Ibérica

O coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758)) é um herbívoro de pequeno porte, pertencente à ordem Lagomorpha e família Leporidae, à qual pertencem 63 espécies de lebres e coelhos (Ruedas et al. 2018). Os registos fósseis colocam a origem da espécie *Oryctolagus cuniculus* na Península Ibérica, há cerca de 900 000 anos (Ferrand & Branco 2007). Atualmente considera-se que esta se divide em duas subespécies, concretamente *O. cuniculus cuniculus* e *O. cuniculus algirus*. Crê-se que a origem desta divisão estará na evolução filogenética divergente de dois grupos que terão persistido isolados ao longo das eras glaciares do período Quaternário, um na região sudoeste ibérica, que terá originado a subespécie *O. c. algirus*, outro na região nordeste ibérica e sul de França, que terá originado a subespécie *O. cuniculus cuniculus* (Ferrand & Branco 2007; Ferrand 2008). A primeira subespécie é considerada endémica no sudoeste da Península Ibérica, embora esteja presente também no norte de África e sido introduzida em algumas ilhas no Mediterrâneo e Atlântico, nomeadamente nos arquipélagos dos Açores e Madeira. A última subespécie referida, a par das populações selvagens, foi amplamente domesticada e selecionada, sendo hoje utilizada globalmente como animal de laboratório, animal de produção, e animal de companhia, tendo surgido diversas raças com tamanhos e cores distintas. (Branco et al. 2000; Carneiro, 2014). A população de coelho-bravo do sudoeste ibérico (*O. c. algirus*) diferencia-se da subespécie *O. c. cuniculus* principalmente pelo peso e dimensão menores, e pela elevada diversidade de parâmetros e aspetos físicos inter e intrapopulações (Ferrand & Branco 2007). A abundância do coelho europeu na Península Ibérica na Antiguidade era caracteristicamente alta, tendo inclusive o imperador Adriano utilizado o coelho como símbolo para adornar a moeda do império Hispano-Romano durante o século II (Soriguer & Palacios 1994). A sua utilidade foi desde cedo reconhecida, como tal foi iniciada a sua domesticação na Idade Média para aproveitamento de carne, pelo e pele; sendo esta a única espécie da Ordem Lagomorpha a ter sido domesticada, e o único mamífero a ser domesticado com sucesso na Europa (Delibes-Mateos et al. 2018). Foi, entretanto, introduzida em diversas outras regiões, estimando-se que desde cerca de 1300-1400 a. C. que são introduzidos coelhos-bravos europeus em ilhas com o propósito de virem a constituir fonte de alimento. Encontram-se atualmente em toda a Europa, Nova Zelândia e Austrália, partes do Chile e da Argentina e em mais de 800 ilhas (Figura 1) (Ferrand & Branco 2007).



**Figura 1- Representação esquemática da possível origem e distribuição das principais populações de coelho europeu.**

As áreas cinzento-escuro representam as regiões onde se presume que as populações originais se terão refugiado durante o Pleioceno, resistindo aos glaciares, e as cinzento-claro a distribuição actual do coelho europeu. As setas a cheio representam expansões antropomediadas e naturais, e as traçadas um fluxo restrito de genes que resultou numa menor diversidade genética. Adaptado de Ferrand & Branco (2007).

### **2.1.2. Morfologia**

É um representante da ordem Lagomorpha de dimensões intermédias, sendo o menor leporídeo presente na Península Ibérica (Soriguer & Palacios 1994), cuja fisionomia se encontra adaptada aos hábitos de pastagem e comportamentos de fuga. Estes obrigam a membros traseiros longos e fortes, com 5 dígitos nos membros anteriores e 4 nos posteriores, faces palmares e plantares cobertas de pelo farto e longo, cobrindo garras de dimensão considerável, e o focinho e orelhas alongadas, embora mais curtas que a cabeça (Delibes-Mateos et al. 2018). A sua fórmula dentária inclui 28 peças dentárias, sem raízes e de corte oval (Soriguer & Palacios 1994). Os pré-molares e molares muito desenvolvidos e os 4 incisivos superiores, um primeiro par de crescimento contínuo, e um segundo, menor, localizado caudal ao mesmo, tornam o animal apto para aceder e ingerir o alimento de que necessita. Também como adaptação à sua posição na cadeia trófica como presa, pelo facto de esta exigir que a sua atividade se dê principalmente entre o crepúsculo e o nascer do sol, a sua visão é alargada e adaptada à escassez de luz (Soriguer & Palacios 1994; Delibes-Mateos et al. 2018).

O seu pelo é normalmente em tons de castanho acinzentado, abundante no pescoço e cinzento claro a branco na região abdominal do tronco e medial dos membros. A cauda, curta, é também cinzento claro ventralmente, e castanho acinzentado dorsalmente (Figura 2) (Delibes-Mateos et al. 2018).

Apesar da óbvia variedade morfológica do coelho doméstico, selecionado para a criação de diversas raças, esta não se traduz numa maior variedade de genomas,

apresentando o coelho-bravo ibérico (*O. c. algirus*) uma maior diversidade genética relativamente às populações de *O. c. cuniculus*. Esta distinção entre as subespécies a nível do ADN mitocondrial é devida ao efeito de gargalo exercido pela extensa domesticação utilizando uma população menor, presumivelmente a francesa, que originou a população de *O. c. cuniculus*, bem como à maior antiguidade da população ibérica, a qual evoluiu de forma natural, causando uma maior variedade de combinações genéticas na população de *O. c. algirus* (Ferrand & Branco 2007; Ferrand 2008; Delibes-Mateos et al. 2018). Quando comparados com o *O. c. cuniculus*, os coelhos da subespécie *O. c. algirus* têm orelhas mais curtas, pesos e dimensões menores na fase adulta, produzindo concomitantemente ninhadas menores (Soriguer & Palacios 1994; Delibes-Mateos et al. 2018). Estudos recentes reiteram esta perceção referindo-se comprimento adulto total de 340-450mm (Delibes-Mateos et al. 2018) e pesos mínimos de 0.180 kg e máximos de 1.400kg (peso médio em adulto de 1.089kg), com aumento linear até aos 0.600kg, diminuindo o ritmo aos cerca de 38 dias de idade (Ferreira & Ferreira 2014), não tendo sido demonstradas diferenças significativas de pesos e de taxa de crescimento entre machos e fêmeas (Gonzalez-Redondo 2013; Ferreira & Ferreira 2014).

O peso destes animais pode sofrer alterações, como por exemplo durante o inverno por perda de massa corporal, mais acentuada em subadultos, que pode atingir os 23%. Além desta perda de peso estar associada a própria fisiologia do coelho, pode também estar associada aos maiores gastos de energia para termorregulação, associados ao rácio área/volume desfavorável do coelho subadulto, às suas menores reservas lipídicas, ou mesmo ao stress social por competitividade com machos coabitantes (Rödel 2005).



**Figura 2 - O coelho-bravo, *O. c. algirus*, na Companhia das Lezírias (foto original).**

### **2.1.3. Alimentação**

A dieta do coelho bravo europeu é, como a de qualquer lagomorfo, do tipo herbívoro generalista, consumindo cerca de 100g de matéria seca diariamente, ou mais 50%, no caso das fêmeas lactantes. Este obtém com eficácia os nutrientes que necessita em diversos tipos de vegetação, conseguindo-o por isso em habitats diferentes, parte da sua referida adaptabilidade (Delibes-Mateos et al. 2018). No entanto, o núcleo da sua dieta consiste em gramíneas e leguminosas, compondo as primeiras a principal fonte de alimento (Soriguer

1988; Marques and Mathias 2001). Como gramíneas, o coelho europeu tem preferência pelas dos gêneros *Lolium* e *Vulpia* (em particular na Península Ibérica), bem como *Festuca*, *Poa*, *Arrhenatherum*, entre outras (Soriguer 1988; Duffy et al. 1996). Durante o inverno, o coelho recorre a raízes e tubérculos para compensar a escassez de fontes de alimento fresco, demonstrando comportamentos de escavação, em particular em climas temperados (Rödel 2005). Em zonas onde competem com outros herbívoros, são obrigados a alimentar-se de frutos ou sementes, tendo desenvolvido também hábitos de destruição de pequenos ramos para aceder a alimento e escavação para aceder a raízes (Soriguer 1988).

Como os restantes lagomorfos, os coelhos têm por hábito a coprofagia, defecando durante o dia fezes compactas e firmes, e de noite fezes de consistência mole - os cecotrofos - os quais são ingeridos (Monk 1989). A digestão destes animais tem a particularidade intestinal de conversão de ureia em proteína pelas bactérias comensais, pelo que o consumo de cecotrofos imediatamente após a sua defecação noturna permite suprir até 15% das necessidades proteicas dos coelhos (Chapman & Flux 2008; Delibes-Mateos et al. 2018).

#### **2.1.4. Fisiologia reprodutiva e ciclo de vida**

A maturidade sexual do coelho-bravo na Península Ibérica é atingida normalmente aos 4-8 meses de idade, dependendo da data de nascimento, ocorrendo nas fêmeas aos cerca de 900g e nos machos aos 750g de peso (Delibes-Mateos et al. 2018).

Os fatores determinantes do início da época reprodutiva no macho são a pluviosidade e o fotoperíodo, relacionados com o aumento do diâmetro testicular, sendo o fator determinante para o término da época reprodutiva o decréscimo de ambos. Assim, inicia-se a exteriorização testicular gradual do abdómen para o escroto, até o diâmetro testicular atingir o pico durante a primavera, iniciando-se a regressão testicular assim que as temperaturas se maximizam e a pluviosidade diminui, finalizando-se no outono (Gonçalves et al. 2002; Delibes-Mateos et al. 2018).

Nas fêmeas a época reprodutiva é dependente do fotoperíodo, bem como da idade maternal e alterações nutricionais na pastagem, estas últimas largamente influenciadas pela precipitação e temperatura (Soriguer & Palacios 1994; Delibes-Mateos et al. 2018). Já Rödel e von Holst (2008) correlacionam o aumento de precipitação no final do verão com a diminuição da atividade reprodutiva nesta mesma época na Alemanha, onde o clima é temperado e os verões mais húmidos, e concluíram também que o atraso no início da época reprodutiva, na sequência de invernos extremos, decorre não da perda de peso por indisponibilidade de alimento, mas sim do mecanismo compensatório utilizado pelas fêmeas, as quais recorrem a reservas energéticas para compensar esta escassez, diminuindo as suas aptidões reprodutivas.

Assim, a reprodução tem geralmente início após as primeiras chuvas da temporada, prolongando-se até finais do verão ou outono, quando a disponibilidade proteica na vegetação

diminui. Pode, no entanto, alargar-se a época reprodutiva, desde que a pastagem providencie os nutrientes necessários (Soriguer & Palacios 1994). Assim, em Portugal, dá-se o início em novembro, estendendo-se até junho, com um pico reprodutivo em março/abril (Gonçalves et al. 2002).

A ovulação é induzida pelo estímulo produzido durante o coito, ocorrendo entre 10 e 12 horas após a cópula. O período gestacional tem 28 a 31 dias, ocorrendo um estro pós-parto que, ao contrário da maioria dos mamíferos, é passível de resultar em gestação imediatamente após o parto. Assim, e dado que o coelho ibérico tem um número médio de crias por ninhada de 3,5 (por oposição ao *O. c. cuniculus*, o qual produz em média 4,7 crias por ninhada), variando entre 2 e 6 crias (Delibes-Mateos et al. 2018), e adicionalmente que a época reprodutiva pode durar até 6 meses, pode afirmar-se que estes animais exibem um potencial reprodutivo alto (Soriguer & Palacios 1994; Bautista et al. 2008). Este, em particular quando conjugado com as elevadas taxas de mortalidade juvenil e curta esperança média de vida desta espécie, no contexto do seu habitat natural, onde as condições climatéricas, os parasitas, doenças infetocontagiosas, predadores e o homem afetam extensivamente a sobrevivência e aptidão reprodutiva dos animais, leva-nos a compreender a razão para a ocorrência de importantes flutuações demográficas sazonais (Soriguer & Palacios 1994; Bautista et al. 2008).

O local do ninho é construído pelas fêmeas vários dias antes do parto, criando uma ramificação curta na toca já estabelecida, ou escavando uma pequena toca separada, geralmente com menos de 1 metro de comprimento, cuja entrada é tapada por detritos que a fêmea escava. O ninho em si é finalizado por vezes apenas horas antes do parto (Bautista et al. 2008), cobrindo a fêmea o solo da toca com plantas e o seu pelo ventral, o qual fisiologicamente se torna fácil de destacar na gravidez tardia por influência hormonal (Delibes-Mateos et al. 2018).

Durante a gestação, flutuações na precipitação (características do clima mediterrânico), conjugadas ou não com competição por alimento com outros herbívoros, pode refletir-se numa diminuição significativa tanto na disponibilidade como na qualidade do alimento adquirível pela fêmea gestante. Estas circunstâncias elevam a mortalidade intrauterina, a qual ativa os mecanismos característicos dos leporídeos de conservação de energia e reabsorção dos embriões, não ocorrendo aborto ou nado-morto (Soriguer & Palacios 1994).

Se levada a término, a gestação produz recém-nascidos altriciais, totalmente dependentes da mãe, nascendo com cerca de 38g de peso, cegos, surdos e glabros (Delibes-Mateos et al. 2018). O parto dá-se durante o dia, período de repouso natural dos coelhos, terminando em cerca de 10-15 minutos mesmo em ninhadas grandes, dado que o grande comprimento da vagina causa rotura do cordão umbilical, exigindo rápida expulsão dos recém-nascidos para prevenir a consequente sufocação. Durante o parto, a fêmea lambe brevemente

cada cria, consumindo as suas placentas. (Bautista et al. 2008) Os recém-nascidos desenvolvem-se muito rapidamente, abrindo os olhos ao final de 7 a 10 dias, e adquirindo audição às duas semanas após o nascimento (Delibes-Mateos et al. 2018). Durante este período, e até abandonarem pela primeira vez o ninho pelo vigésimo dia de vida, as crias são alimentadas pela fêmea em períodos de 3-4 minutos, com um intervalo de 24h, cobrindo o ninho com os seus próprios dejetos e urina imediatamente após cada amamentação, os quais aí se vão acumulando (Bautista et al. 2008).

O desmame dá-se ainda no ninho, o qual se inicia com a ingestão das fezes sólidas da progenitora e dos componentes do ninho (Bautista et al. 2008). Os juvenis abandonam então permanentemente o ninho ao final de 23 a 25 dias após o nascimento, pesando por essa altura cerca de 90g (especificamente os jovens *O. c. algirus*) (Delibes-Mateos et al. 2018), tendo, não obstante o seu peso, uma extraordinária autonomia (Soriguer & Palacios 1994).

A sobrevivência dos juvenis está amplamente limitada pela predação, doenças, competição e agressão, sendo que no primeiro ano de vida as taxas de mortalidade comumente excedem os 90% (Delibes-Mateos et al. 2018). As condições climáticas também parecem influenciar a sobrevivência de subadultos e juvenis, diminuindo a sobrevivência ao inverno quando este atinge condições extremas, ou quando os primeiros meses de vida coincidem com altas precipitações no outono. Estas circunstâncias dificultam a preservação da temperatura corporal, diminuindo a condição corporal das crias, e aumentam a prevalência de coccidioses, por aumento de suscetibilidade e por condições ideais (humidade alta). A sobrevivência a estas adversidades é melhorada quando a condição corporal dos juvenis e subadultos no inverno é melhor, estando maiores pesos associados a maiores percentagens de gordura e por isso termorregulação mais eficiente e reservas lipídicas compensatórias da escassez de alimento (Rödel & von Holst 2008). Já a sobrevivência dos adultos raramente ultrapassa os seis anos de vida, sendo que a maioria vive pouco mais que dois anos (Delibes-Mateos et al. 2018), não estando aparentemente a sua sobrevivência relacionada com as condições climáticas (Rödel & von Holst 2008).

#### **2.1.5. Hematologia**

Algumas particularidades na fisiologia do coelho deverão ser equacionadas ao avaliar a sua hematologia, por forma a não influenciar os diagnósticos. Exemplificando, nas fêmeas o padrão granulocítico sofre uma transformação em linfocítico nos primeiros dias do pós-parto, que deve ser considerada, e a acidofilia característica dos granulócitos neutrófilos do coelho é frequentemente causa de erro na sua contagem, sendo estes apelidados de “heterófilos” (Melillo 2007; Marshall 2008). A distinção é feita através da dimensão das células comparativamente aos eosinófilos *per se*, as quais são distintamente maiores, bem como da observação dos grânulos, maiores e mais distintos nos eosinófilos. Quando observados, os

heterófilos são por norma segmentados, surgindo em banda muito raramente. Também é frequente observar, sem significado clínico, policromasia, a qual se deve principalmente à curta duração dos eritrócitos, e anisocromasia, dada a variabilidade do diâmetro dos glóbulos vermelhos entre 5 e 7.8µm (Marshall 2008). Os valores de referência mais recentes para os componentes hematológicos do coelho, estudados no coelho doméstico (*O. c. cuniculus*) estão discriminados na tabela 1.

**Tabela 1 - Valores de referência, diferenciais e absolutos, para os parâmetros hematológicos do coelho doméstico (*O. c. cuniculus*).**

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor de referência</b>
Hematócrito	28-48%
Hemoglobina	89.63–153.82 g/L
Eritrócitos	4,37–7,43 x 10 <sup>12</sup> /L
Linfócitos	32-81% e 0,36-6,58 x10 <sup>9</sup> /L
Basófilos	0,06-1,10 x10 <sup>9</sup> /L e <5% (>4 meses idade (mi.)) ou <8% (1.5-4 mi.)
Eosinófilos	0,07-0,19 x10 <sup>9</sup> /L e <4% (>4 mi.) ou <15% (1.5-4 mi.)
Heterófilos segmentados	15-60% e 0,87-7,82 x10 <sup>9</sup> /L
Monócitos	<12% e 0,08-1,71 x10 <sup>9</sup> /L
Leucócitos	2,71-12,23 x10 <sup>9</sup> /L
Plaquetas	225,45-905,3 x10 <sup>9</sup> /L

Adaptado de Hein & Hartman (2003) e Leineweber et al. (2018), respetivamente, para os valores diferenciais e para os absolutos.

Desvios nestes valores podem estar associados a patologia, idade, sexo, ou indicar reações fisiológicas a alterações sazonais ou ambientais. Exemplo disto é o facto de os coelhos jovens apresentarem, até às 4 semanas de idade, contagens absolutas menores de leucócitos, basófilos, eosinófilos e eritrócitos (Jeklova et al. 2009). O rácio neutrófilos/linfócitos é igualmente afetado pela idade, sendo de 33:60 aos dois meses de idade, já que as crias têm valores altos de linfócitos, os quais começam a diminuir aos três meses, igualando-se este rácio aos doze meses (Leineweber et al. 2018). Sabe-se também que os valores absolutos de linfócitos e leucócitos são menores ao final da tarde e durante a noite, em simultâneo com o aumento das contagens de heterófilos e eosinófilos (Melillo 2007).

Quando expostos a *stress*, estes animais sofrem um aumento na pressão arterial, por consequência de libertação de cortisol. O quadro hematológico é assim alterado, ao ser desencadeado o desvio do pool marginal de heterófilos, surgindo valores diferenciais e absolutos aumentados, com desvio à direita e linfopenia relativa. Se ocorrer de forma crónica, o *stress* leva a leucopenia, heterofilia e linfopenia absoluta (Melillo 2007, Marshall 2008).

Em casos de infeção, a resposta imunitária típica é granulocítica, considerando-se provável a presença duma resposta inflamatória quando a percentagem diferencial de heterófilos se encontra entre 60 e 80 (Benson & Paul-Murphy 1999), sendo tipicamente

acompanhada de neutrofilia acentuada e linfopenia (Melillo 2007; Marshall 2008). Nestes animais, o quadro de hipersensibilidade ou infecção parasitária, contrariamente ao do gato ou o do cão, raramente apresenta eosinofilia, a qual é mais frequente quando os tecidos ricos em mastócitos, tais como a pele, pulmões, trato gastrointestinal ou útero, estão afetados (Melillo 2007).

### **2.1.6. Estrutura social e comportamento**

Os coelhos europeus são, contrariamente à maioria dos lagomorfos, animais altamente sociais. Embora estejam ativos durante o dia, a atividade maioritária destes animais dá-se à noite, em especial durante o crepúsculo e, dependendo da época do ano, também ao amanhecer. A maioria do seu dia-a-dia é despendida a obter alimento, interagindo com o ambiente exterior, ou a construir tocas complexas e dimensionadas, nas quais se dá a maioria das interações sociais destes animais, embora possam também ocupar formações naturais como gretas no solo ou troncos ocos (Soriguer y Palacios 1994; Rödel et al. 2006; Delibes-Mateos, 2018).

Estas habitações, as coelheiras, albergam cerca de quatro fêmeas e um ou dois machos adultos, um dominante, o único reprodutor, e respetivas crias em sociedades organizadas, cuja hierarquia é imposta de diversas formas. *A priori*, as crias de cada ninhada com maior peso ao nascimento serão igualmente as que terão acesso a mais leite materno, conseqüentemente maior peso adulto e assim serão dominantes entre os restantes da mesma ninhada (Bautista et al. 2008).

Não obstante, no interior das tocas, onde a competição é maior, as fêmeas dominantes servem-se das glândulas do queixo para marcar território, fuçando objetos ou outros coelhos (Delibes-Mateos et al. 2018). Estas fêmeas dominantes procriam nos locais mais seguros da toca, sendo as restantes obrigadas a nidificar na periferia ou mesmo fora da toca (Rödel et al. 2006). Já os machos competem pela dominância em interações agressivas, utilizando os poderosos membros traseiros para pontapear rivais, e para pular enquanto projetam a sua urina como marcação de território, bem como os dentes e garras como armas complementares (Delibes-Mateos et al. 2018).

Estas interações culminam na expulsão dos subordinados da coelheira e em traumatismos que podem inclusive ser fatais (Rödel et al. 2006). Fora das tocas, o macho dominante urina e marca as suas fezes com secreções de glândulas anais, ao construir latrinas, delimitando o território com o seu odor individual, para que os diferentes coelhos do grupo que integram se reconhecerem entre si, afastando membros de grupos diferentes (Delibes-Mateos et al. 2018). Para esse efeito, este pode despender mais 30% do seu tempo no exterior das tocas do que as fêmeas (Soriguer & Palacios 1994). Mesmo durante o desenvolvimento neonatal, ainda no ninho, estes animais competem pelo local mais vantajoso do ponto de vista da temperatura, procurando colocar-se centrais e insulados pelos restantes

membros da ninhada, trepando constantemente os irmãos e irmãs (Bautista et al. 2008). Neste período, o comportamento dos coelhos é condicionado por marcas olfativas emitidas pela fêmea progenitora, a qual emite a feromona mamária, que não só direciona as crias para a mama enquanto forem cegas e surdas, como potencia a memorização a longo prazo dos odores do ninho e da progenitora. Os principais odores que atraem os recém-nascidos são aqueles presentes no leite, nos cecotrofos da fêmea e no âmnio, marcados pelos componentes da dieta da progenitora, condicionando as preferências alimentares dos coelhos mesmo após o desmame, por memória olfativa (Schaal et al. 2008). A competição desde cedo no desenvolvimento dos coelhos em ninhadas capacita-os em adultos a competir por recursos com outros membros da comunidade (Bautista et al. 2008).

### **2.1.7. Habitat preferencial**

Geralmente as populações de coelho europeu ocorrem em altitudes médias a baixas, raramente ultrapassando os 1500m (Delibes-Mateos et al. 2018), exigindo pluviosidades anuais médias, dado que sofrem grandes perdas em períodos de seca. Atingem, assim, números maiores em climas mediterrânicos, onde os verões são quentes e os invernos temperados, e as pluviosidades rondam os 400-600mm anuais, distribuídos ao longo de vários meses, condições que garantem disponibilidade de alimento e alargam a época reprodutiva (Delibes-Mateos et al. 2018).

O coelho bravo europeu depende dos abrigos providenciados pela vegetação ou tocas para escapar a predadores, pelo que habita espaços abertos contanto que consiga construir coelheiras (Soriguer & Palacios 1994; Delibes-Mateos et al. 2018).

Nas regiões onde o solo impossibilita a escavação, ou regiões onde há predominância de plantas herbáceas, por serem propícios a inundações, ou regiões abertas por não providenciarem abrigo diurno, estão limitados pela impossibilidade de constituir abrigo, pelo que muitas vezes são obrigados a reproduzir-se dentro de troncos ocos, habitando apenas marginalmente florestas e bosques (Soriguer & Palacios 1994; Carvalho & Gomes 2004).

Assim, idealmente, o seu habitat é constituído por solos áridos a semiáridos, bem drenados, que permitam a escavação de tocas, em regiões que conjuguem disponibilidade de alimento com abrigo diurno, adaptando-se, no entanto, a quase todo o tipo de habitat e uma elevada amplitude de condições climáticas (Williams et al. 1995; Delibes-Mateos et al. 2018). Particularmente no sudoeste ibérico, a paisagem tradicional dos “montados” de sobreiro ou azinheira em Portugal (Figura 3), providenciam o habitat intermédio entre a pastagem e o mato, ideal para o coelho e por isso é aí que se podem encontrar as maiores populações do país (Gálvez et al. 2008). Nestas condições o coelho-bravo obtém refúgio pelos arbustos, campo aberto para pastagem, e solos que permitem a construção de tocas resistentes a inundações (Soriguer & Palacios 1994).



**Figura 3 - Exemplo de um habitat de coelho-bravo, na Companhia das Lezírias.**

Podem ser observadas, centrais na fotografia, quatro escavações no solo, que presumivelmente darão acesso a uma coelheira. É possível observar, igualmente central, um sobreiro (*Quercus suber*) em crescimento e, na vizinhança, plantas arbustivas (fotografia original).

### **2.1.8. Ecologia trófica**

#### **2.1.8.1. O paradoxo ecológico do coelho europeu**

Como tantos outros herbívoros sedentários, o coelho-bravo europeu tem comportamentos que lhe permitem obter os nutrientes e criar condições necessárias para singrar nos habitats que ocupam. Esta plasticidade ecológica e capacidade de adaptar comportamentos a disponibilidades diferentes de comida e abrigo para máximo usufruto de recursos são evidenciadas pela sua distribuição mundial em habitats díspares (Lombardi et al. 2003).

No caso, os principais hábitos com efeito ecológico deste animal incluem a deposição de fezes, a escavação, o trilhar de solos e vegetação, e a pastagem (Gálvez et al. 2008). A influência de cada uma destas atividades pode manifestar-se de forma variada: ao construir latrinas, isto é, acumulações dimensionadas de fezes, os efeitos são sentidos na composição química do solo, facilitando o crescimento de vegetação em solos pouco intervencionados e aumentando a variedade da vegetação e fertilidade de solos em regiões semiáridas com pouca pastagem, simultaneamente servindo de alimento a invertebrados e tomando a função de focos de sinalização territorial (Delibes-Mateos et al. 2008; Gálvez et al. 2008). As suas escavações tornam-se frequentemente áreas subterrâneas que chegam a atingir os 15m de raio, com efeitos sentidos ainda mais longinquamente, que substituem o abrigo providenciado pela vegetação, onde esta não existe (Gálvez et al. 2008). Estas podem ser ocupadas por diversas espécies, como é o exemplo dos lagartos, a cobra de rateira e o texugo euroasiático, promovendo a sua sobrevivência e abundância e a diversidade do ecossistema (Delibes-Mateos et al. 2007). O trilhar e a pastagem pelo coelho-bravo poderão originar alterações na vegetação que por sua vez condicionam presença e abundância de outras espécies, sejam

elas insetos ou vegetais, modificando a estrutura e organização do ecossistema (Delibes-Mateos et al. 2008, Delibes-Mateos et al. 2018). Estes animais podem então ser considerados engenheiros de ecossistemas, e por isso uma espécie colonizadora, com enorme impacto ecológico (Gálvez et al. 2008, Delibes-Mateos et al. 2008). Também por constituir alimento de diversos predadores de pequeno e médio porte, como raposas, gatos, doninhas, e aves de rapina, o coelho-bravo toma uma função trófica de base. Em particular na Península Ibérica, o seu papel como presa tem uma influência considerável na conservação de diversas espécies predadoras ameaçadas, incluindo o lince ibérico (*Lynx pardinus*), actualmente considerado ameaçado (Rodríguez & Calzada 2015) e a águia imperial (*Aquila adalbertii*) actualmente com estatuto de vulnerável (BirdLife International 2017), bem como de várias outras espécies de interesse, para as quais o coelho constitui presa (Delibes-Mateos et al. 2007, Lees & Bell 2008). É sabido que quando a população duma espécie da base da cadeia alimentar é afetada, o efeito é sentido nos vários níveis tróficos, nesta circunstância o adicional papel ecológico amplo do coelho torna a redução das suas populações exponencialmente mais grave para o seu ecossistema, afetando um maior número de espécies (Chapman & Flux 2008; Cabezas-Díaz et al. 2009). Esta é considerada uma espécie-chave nos ecossistemas da bacia mediterrânica, onde tem papel central em conservar a biodiversidade e organização (Lees & Bell 2008; Delibes-Mateos et al. 2007; Gálvez et al. 2008).

Em certos locais colonizados pelo coelho bravo europeu, condições ecológicas excepcionais, como a abundância de alimento e ausência de predadores, levaram à sua sobrepopulação, pelo que obtiveram o estatuto de invasor biológico ou de peste (Lees & Bell 2008). Nestes habitats favoráveis, a sua invasão e expansão tem tido efeitos desfavoráveis na ecologia local, corrompendo quantitativa e qualitativamente fauna e flora, e na agricultura, onde deturpou as pastagens destinadas a animais de produção e competiu por pastagens, chegando mesmo a tornar vulnerável o solo à erosão e a inviabilizá-lo para culturas futuras. É considerado, na Austrália, uma das pestes vertebradas de maior importância económica, estimando-se os seus estragos anuais no valor de 20 milhões de dólares australianos, apenas ao nível da região pastoral (Williams et al. 1995; Bird et al. 2012).

Paradoxalmente, na Península Ibérica, onde são essenciais ao equilíbrio ecológico, têm vindo a sofrer declínios significativos das suas populações nas últimas décadas (Cabezas-Díaz et al. 2009; Delibes-Mateos et al. 2009) tendo mesmo sido declarados como quase ameaçados (Queiroz et al. 2005).

#### **2.1.8.2. Fatores condicionantes à conservação**

Diversas causas têm sido apontadas para as perdas observadas nas populações de coelho-bravo em Portugal, principalmente as perdas de habitat, sejam por abandono ou alteração, e o surgimento de doenças virais de elevada morbilidade e mortalidade como a Mixomatose e a Doença Hemorrágica Viral (DHV) (Delibes-Mateos 2009). É sabido que a mortalidade desta espécie é influenciada por diversos fatores, como idade, clima, densidade

populacional, predação, enfermidades, sendo que em particular as doenças infetocontagiosas como a Mixomatose e a Doença Hemorrágica Viral afetam também a eficiência reprodutiva das populações (Tablado et al. 2012). Mais recentemente, foi descrita a possibilidade do aumento da virulência do vírus da DHV, que já foi apontada como consequência do aumento da resistência ao mesmo pelas populações de *O. cuniculus* na Austrália, após introdução artificial do vírus, tendo ocorrido uma evolução inesperada do mesmo (Elsworth et al. 2012), contrária àquela ocorrida no vírus da Mixomatose, que sofreu atenuação espontânea (Elsworth et al. 2014).

Concretamente em Portugal, o coelho-bravo é uma espécie de caça menor tradicionalmente valorizada, sendo uma das maiores fontes de rendimento na cinegética, estimando-se o abate de 330 000 coelhos por atividade cinegética no ano de 2014. Ao deparar-se com a sua escassez, os caçadores recorreram à caça maior. Alguns caçadores e gestores de áreas cinegéticas, inconformados, realizaram reforços de populações de coelho não autorizados, utilizando animais criados em cativeiro oriundos de Espanha, muitas vezes da subespécie *O. c. cuniculus* – os quais originaram descendências híbridas mais suscetíveis que os nativos da subespécie *O. c. algerus*, com o efeito final antagónico de diminuição da população. Adicionalmente ao fator cinegético, as reformas à agricultura em Portugal inevitavelmente alteraram habitats selvagens. No caso vertente, zonas com forragem e cobertura, ideais para o coelho selvagem, foram em parte substituídas por mato, mais adequado a ungulados de caça maior, que vieram afastar o coelho destes habitats e substituí-lo na atividade cinegética (Cabezas-Dias et al. 2009; Paiva et al. 2017).

Apesar do já expectável esforço imposto por grupos de agricultores e caçadores com importância socioeconómica, que terão feito com que governos e investigadores tenham evitado alterar oficiosamente o status do coelho e tomar medidas claramente necessárias (Virgós et al. 2007), o coelho-bravo foi finalmente listado como “quase ameaçado” em Portugal, no livro vermelho dos vertebrados, em 2005 (Queiroz et al. 2005).

### **2.1.8.3. Projetos de controlo da população**

As flutuações demográficas do coelho europeu têm exigido medidas de controlo há muito, tanto para reverter a sua escassez como a sua desmedida proliferação e consequentes danos ecológicos e económicos (Virgós et al. 2007; Tablado et al. 2012; Cox et al. 2013).

No caso da Austrália, exemplar como um país no qual o coelho tomou papel de peste e causou danos económicos e ecológicos significativos desde cedo na sua introdução, o objetivo principal tem sido a diminuição da abundância das suas populações, demasiado numerosas e negativas para a fauna e flora locais. Dedicados a esse propósito, tomaram medidas primárias, como iscos envenenados, fumigação e destruição de tocas. Como métodos físicos complementares, as vedações tiveram um papel relevante na proteção agrícola, em desuso hoje graças à eficácia dos métodos biológicos de controlo, como a

introdução da DHV, na década de 1980, e do vírus da Mixomatose, na década de 1950 (Williams et al. 1995; Cox et al. 2013).

Já na Península Ibérica, os esforços têm sido concentrados em aumentar os números de coelhos, tanto por razões económicas no que toca à atividade cinegética e receita por ela gerada, como por razões ecológicas relativamente à conservação de predadores dependentes do coelho, como é o caso do lince ibérico (Cabezas-Dias et al. 2009; Ferreira & Delibes-Mateos 2010). Foi oficialmente implementado em Portugal, em 2007, um programa de recuperação do coelho (PRECOB) em despacho do Diário da República. Considerando a evolução do vírus da DHV (VDHV) numa nova estirpe resistente às vacinas – o VDHV2 - um novo despacho, colocou em prática um plano de ação para controlo da DHV, com o objetivo de inverter o processo de declínio das populações de coelho-bravo em Portugal (Despacho n.º 4757/2017). No contexto deste programa, as ações tomadas, embora algumas tenham antes sido estabelecidas, têm sido variadas: controlo da predação, estudo, monitorização e controlo da mortalidade associada à DHV, através de colheita de amostras biológicas com o auxílio dos gestores cinegéticos, introdução de populações, manejo de habitats, consciencialização social e implementação de boas práticas na gestão das populações selvagens. A tarefa de controlo da predação é legalmente incumbida em geral aos caçadores, que tratam de armadilhar e alvejar predadores, atingindo principalmente a raposa (*Vulpes vulpes*) e o sacarrabos (*Herpestes ichneumon*), havendo, no entanto, outros que fora da lei procuram atingir outras populações predatórias, tais como outros mamíferos carnívoros e aves de rapina (Paiva et al. 2017). O manejo de habitats consiste principalmente na criação de regiões próprias para alimentação, disponibilizando forragem ou pastagem ou comedouros onde necessário, bem como na plantação de arbustos para refúgio ou construção de tocas onde este é escasso ou impossível de cultivar (Ferreira and Alves 2009). Como medidas preventivas de mortalidade, as principais são a vacinação dos animais contra a Mixomatose e a DHV (Cabezas et al. 2006), e a diminuição da pressão cinegética (Calvete et al. 2005). A introdução de populações é conseguida através do transporte de coelhos com boa condição corporal e vacinados para locais onde se prevê prosperidade reprodutiva, com habitats munidos dos recursos necessários, embora a eficácia desta medida seja controversa, estando largamente limitada pela suscetibilidade aumentada de animais com condição corporal insuficiente quando sujeitos a transporte e vacinação (Cabezas et al. 2006; Carro et al. 2019).

## **2.1.9. Doenças infetocontagiosas**

### **2.1.9.1. A Doença Hemorrágica Viral**

O VDHV é um vírus da família *Caliciviridae*, passível de infeção após injeção, apresentando apenas uma proteína específica do vírus (Ohlinger et al. 1990). Foi detetado pela primeira vez em coelhos Angorá na China, originários da República Democrática da Alemanha, em 1984, tendo infetado 140 milhões de coelhos em cerca de 50 000 km<sup>2</sup> nesse

primeiro ano, e atingido a Europa em 1986 (Portugal em 1988, detetado pela primeira vez na ilha da Madeira) (Abrantes et al. 2012). O vírus foi no ano de 1991 introduzido na Austrália como procedimento de controlo das populações de coelho europeu, ali designadas como pestes, como teste, controlado e isolado numa ilha. No entanto, e apesar de rigorosamente controlado, em 1995 deu-se a fuga da estirpe estudada, presumivelmente através de insetos vetores voadores, para o continente Australiano (Williams et al. 1995). Esta estirpe parece ter origem anterior à primeira epidemia, sendo estimada a sua origem genética algures entre as últimas décadas do século XIX e a primeira metade do século XX (Alda et al. 2010). Pertencente ao género *Lagovirus*, apresenta proximidade genética com outros vírus presentes nos lagomorfos, como o vírus europeu da lebre castanha, conhecendo-se hoje várias estirpes do VDHV presentes exclusivamente no coelho (Lavazza & Capucci 2008).

O vírus, descrito nos primórdios do seu estudo como altamente mortal e contagioso, causa hemorragias internas extensas, com estado do cadáver aparentemente saudável externamente, sendo detetável consistentemente com hemorragia pulmonar (Xu & Chen 1989). Na forma mais frequente, a aguda, surgem em 1 a 3 dias sinais como febre, opistótonos, ataxia, paralisia; por vezes também sinais respiratórios, congestão nasal e lacrimal podendo ocorrer epistaxis e hemorragias oculares. Na sua forma hiperaguda, a doença não desenvolve sintomas e os animais morrem subitamente. Na forma subaguda, os animais desenvolvem graus menos severos dos referidos sintomas, sobrevivendo a maioria, que assim se torna imunizada, ocorrendo também uma forma crónica, caracterizada por icterícia severa, anorexia e apatia, que culmina na morte dos animais afetados em cerca de uma a duas semanas, ou na sobrevivência e subsequente imunização com altos títulos de anticorpos (Marcato et al. 1991).

Principalmente o fígado, pulmões e baço são afetados pelo VDHV, sendo distintos os sinais histopatológicos nestes tecidos. Assim, à necrópsia, os sinais mais notados são a hepatite aguda por apoptose de hepatócitos e a esplenomegália, aliados a congestão em vários órgãos, consequência da coagulação intravascular disseminada, a qual é geralmente atribuída como causa de morte (Abrantes et al. 2012).

A infeção dá-se por contacto direto com animais ou cadáveres infetados, via oral, nasal, conjuntival e parenteral, ou através de fómites ou insetos hematófagos, que se tornam vetores (Marcato et al. 1991; Lavazza & Capucci 2008). O vírus permanece viável no ambiente por menos de um mês, e cerca de três meses quando presente em tecidos infetados em decomposição, parecendo a sua sobrevivência ser principalmente dependente da temperatura, humidade e exposição a luz ultravioleta (Henning et al. 2005). Sabe-se hoje que as subespécies *O. c. algirus* e *O. c. cuniculus* são igualmente suscetíveis, tendo sido descritas mortalidades, morbidades e prevalências semelhantes. (Muller et al. 2009)

Como vírus RNA, o VDHV tem uma elevada mutabilidade, tendo vindo a evoluir rapidamente desde a sua primeira aparição (Muller et al. 2009). Assim, têm sido detetados

aumentos de virulência e adaptações rápidas aos aumentos de resistência pelas populações. Em certas regiões da Austrália, os números iniciais de coelhos foram repostos desde a primeira epidemia, por presumível aumento de resistência (Saunders et al. 2010; Elsworth et al. 2012). No entanto, na Península Ibérica, tem surgido sucessivas epidemias, a mais recente graças a uma nova estirpe do VDHV que emergiu em 2012, o VHDV2, explicadas, em parte, por fatores ambientais, mas também individuais e do próprio vírus (Abrantes et al. 2013; Elsworth et al. 2014). Atualmente sabe-se que a estirpe presente nesta região tem origem naquela detetada em Espanha e França (Abrantes et al. 2013). Do ponto de vista anatomopatológico e clínico, esta variante do vírus parece não diferir na natureza dos sinais, e sim principalmente no facto de surgir mais frequentemente na forma hiperaguda e afetar na mesma medida populações jovens e adultas (Neimanis et al. 2018).

### **2.1.9.2. Mixomatose**

O vírus da Mixomatose é um Poxvírus, pertencente ao género *Leporipoxvirus*, existindo dois subtipos geográficos do vírus: o californiano e o sul-americano, que causam, nos seus hospedeiros naturais (*Sylvilagus bachmani* e *S. brasiliensis*, respectivamente), um fibroma cutâneo benigno (Kerr & Best 1998).

A versão do vírus presente na Europa é originária da América do Sul, documentada pela primeira vez em finais do século XIX em coelhos de laboratório, isto é, coelhos europeus, no Uruguai, como uma doença fatal desconhecida, acreditando-se, no entanto, existir conhecimento anterior da doença por criadores sul-americanos de coelhos (Kerr 2012).

Este foi depois introduzido na Austrália, na década de 1950, sob forma de controlo para a expansão desmedida das populações de coelho ibérico (Saunders et al. 2010); e mais tarde para França, de onde foi ilegalmente transportado para o Reino Unido, causando globalmente mortalidades de 99% (Arthur & Louzis 1988; Calvete et al. 2002). Rapidamente foram observadas epidemias no restante continente europeu, incluindo a Península Ibérica. Nestes sítios, onde o principal lagomorfo era o suscetível coelho europeu, o vírus teve efeitos mais negativos na saúde das suas populações, originando perdas significativas. Desde então, dão-se epidemias aproximadamente anuais, geralmente no verão ou outono, sendo o padrão variável consoante a localização geográfica, associadas à transmissão pela pulga *Spilopsyllus cuniculi*, abundante durante a época reprodutiva do coelho (Calvete et al. 2002).

Dada a dinâmica populacional do coelho, com curtas esperanças médias de vida e elevadas taxas reprodutivas, a introdução do vírus da Mixomatose, e subsequente dispersão para a Europa, foi um exemplo pragmático da coevolução hospedeiro-vírus, que permitiu avaliar os efeitos numa população num espaço de tempo relativamente curto, modelando o paradigma para outras doenças infecciosas em evolução, por exemplo, em humanos, de progressão significativamente mais lenta (Kerr 2012; McCallum 2015). Foi possível observar,

após cada epidemia, uma redução nas taxas de mortalidade de cada estirpe do vírus, tendo a mortalidade diminuído significativamente em menos de uma década (McCallum 2015).

A infecção dá-se facilmente por contacto direto com lesões epiteliais ou secreções nasais ou conjuntivais de animais doentes, ou com animais portadores da doença, bem como através de artrópodes vetores hematófagos (Calvete et al. 2002).

Após o período de incubação (2-4 dias), os efeitos do vírus da Mixomatose são diversos, desde os inofensivos fibromas autolimitantes e circunscritos nas espécies de coelho americanas (*Sylvilagus brasiliensis*), aos efeitos fatais no coelho europeu, sentidos principalmente ao nível da pele. O primeiro sinal em coelhos inoculados em laboratório é vermelhidão e inchaço no local da inoculação, aumentando o volume desta lesão rapidamente até aos 10 dias pós-infecção (PI). As inflamações anogenital e conjuntival e consequentes pápulas epiteliais ao nível facial e auricular, surgem ao 6º dia pós-infecção, que originam secreções serosas que se tornam mucopurulentas exuberantes, e por fim cegueira, seguida de fadiga e febre. Por norma, estes coelhos apresentam na fase final da doença um edema generalizado da cabeça e orelhas, blefaroconjuntivite e rinite mucopurulentas, com as narinas constrictas e pálpebras fechadas pelo inchaço. Surgem concomitantemente múltiplos nódulos de diversas dimensões (poucos milímetros a vários centímetros de diâmetro), circulares, disseminados pelo corpo, designados de tumores ou comumente mixomas. A doença culmina na morte dos animais afetados ao final de 10 a 12 dias após a infecção. À autópsia, os sinais externos são os mais característicos, sendo possível observar linfadenomegália, esplenomegália, congestão hepática e potencialmente hemorragias superficiais nas diversas vísceras (Kerr 2012).

Além da patogenia inerente ao vírus que causa esta doença, tem sido igualmente estudada a relação das epidemias de Mixomatose com as prevalências de parasitoses, e inversamente a relação da intensidade das infeções parasitárias com os títulos de antigénios anti-Mixomatose. Estabeleceu-se uma relação inversamente proporcional entre a intensidade da excreção de oocistos de coccídias com os títulos antigénicos contra a Mixomatose (Berto-Moran, 2013), e um aumento da suscetibilidade a nematodes aquando de infecção concomitante com o vírus da Mixomatose (Boag 1988; Cattadori et al. 2007).

### **2.1.9.3. Parasitoses do coelho**

Numerosos estudos foram desenvolvidos à data relativamente à parasitologia do coelho europeu, infelizmente a maioria utilizando como objeto a subespécie *O. c. cuniculus* e localizados fora da Península Ibérica, tendo o primeiro estudo direcionado para o *O. c. algirus* sido publicado por Blasco et al., em 1996. Este estudo, que finalmente averiguou prevalências de parasitas gastrointestinais em *O. c. algirus* na Península Ibérica descreve prevalências globais mais elevadas em machos, e prevalências médias globais na ordem dos 90%.

O parasitas gastrointestinais mais frequentemente identificados são as coccídias *Eimeria* spp., o cestode *Mosgovoyia ctenoides* (atualmente conhecido como *Cittotaenia ctenoides*), e nematodes, das espécies *Graphidium strigosum*, *Trichostrongylus retortaeformis*, *Nematodiroides zembrae* e *Passalurus ambiguus* (Blasco et al. 1996; Eira et al. 2007). Outros podem também ser detetados, apresentando, no entanto, prevalências francamente menores: o cestode *Cittotaenia denticulata* e os nematodes *Dermatoxys hispaniensis* *Gonglyonemma neoplasticum* (prevalências de cerca de 15%, 24% e 11%, respetivamente) surgindo raramente (prevalência <10%) infeções por *Trichuris leporis*, *Leporidotaenia wimerosa* e *Andrya cuniculi*. (Eira et al. 2007; Foronda et al. 2003).

### 2.1.9.3.1. Ciclo de vida de parasitas gastrointestinais

De seguida será abordado o ciclo de vida das espécies mais frequentes e abundantes nos coelhos-bravos em Portugal, identificando-se os helmintes que Eira et al. (2007) referiram constituir 99,7% de todos os helmintes encontrados, bem como as espécies de coccídias listadas em coelhos ibéricos por Silva et al. (2015).

#### ***Cittotaenia ctenoides***

O parasita *C. ctenoides* (sinónimo *Mosgovoyia ctenoides*) é um de dois cestodes anoplocefalídeos que parasitam o coelho ibérico (sendo o segundo *C. denticulata*) (Foronda et al 2003; Eira et al. 2007). Em adulto, pode atingir 30-80cm de comprimento e até 1cm de largura (Mehlhorn 2016). De entre os parasitas enumerados, excluindo coccídias, este é o que mais danos causa na condição corporal do coelho (Eira et al. 2007).

Estão documentados como hospedeiros intermédios deste parasita os seguintes ácaros de vida livre: *Achipteria coleoptram*, *Cepheus cepheifotvnis*, *Galumna nervosus*, *G. obivius*, *Liacarus coracinus*. *Liebstadia similis*, *Pelops curomius*, *P. tardus*, *Scutovertex minutus*, *Schelorbates* spp., *S. laevigatus* *Trichoribates incisellus*, *Xenillus tegeocrantis* (Denegri 1993). Sobre o ciclo de vida deste parasita, sabe-se que a infeção se dá através do hospedeiro intermediário ou ingestão direta de cisticercoides, e que a deposição de ovos (oncosferas) se dá ao nível intestinal. O restante do desenvolvimento foi demonstrado no interior de ácaros, desde a fase de oncosfera, ingerida pelo ácaro, à larva do tipo cisticercoide, fase infetante (Denegri 1993).

#### ***Graphidium strigosum***

Pertencente à família Trichostrongylidae, é o único do género *Graphidium* e parasita exclusivamente *O. cuniculus*, sendo uma de apenas duas espécies da subfamília Ostertagiinae que parasitam os lagomorfos (Massoni et al. 2011; Bowman et al. 2014).

Na forma adulta, este atinge 15 mm (macho) a 20 mm (fêmea) (Mehlhorn 2016), e as suas espículas podem medir até 2,4 mm (Bowman et al. 2014).

Ao longo do seu ciclo de vida, após eclosão da L1, passam por 3 estádios larvares livres, morfologicamente muito similares: L1 (1 dia após eclosão), L2 (2 a 4 dias após eclosão)

e L3 (5 a 8 dias após eclosão). A L3 infetante é ingerida, sendo observável a sua presença no estômago do hospedeiro, onde perdem a cutícula que as protege. Aos 8 dias após a infecção surge o estágio larvar parasitário L4, podendo manter-se a sua presença no estômago aos 32 dias após infecção. Neste, inicialmente a L4 encontra-se encapsulada pela cutícula da fase L3, seguindo-se o desvendar da L4, à qual se segue o estágio de larva imatura, sendo esta observável cerca de 18 dias após a infecção. Por fim, aos 32-36 dias após infecção dá-se a evolução para o estágio de adultos, ocorrendo a fecundação após ejeção de gametócitos pelos adultos, dando-se a excreção de ovos fecundados, que desenvolvem L1 no interior, as quais eclodem no exterior do hospedeiro, após 18h a 24°C (Massoni et al. 2011).

A intensidade da infecção com este parasita é diretamente proporcional à idade do seu hospedeiro, parecendo não haver imunidade adquirida com a infecção recorrente. Esta parasitose é mais prevalente em ambientes mais húmidos (Eira et al. 2007).

#### ***Nematodiroides zembrae***

O nematode tricostrongilídeo *Nemadiroides zembrae*, também documentado como *Nematodirus zembrae* (Marhoon et al. 2018), pode ser encontrado no terço anterior do intestino delgado, onde atinge dimensões até 12,4mm, sendo os machos menores (Audebert, Cassone, et al. 2002).

Os ovos, excepcionalmente resilientes, expelidos nas fezes do hospedeiro, aportam uma larva, a qual passará lentamente por três estádios larvares antes de eclodir a L3 infetante, que virá a ser ingerida. Este período de vida livre dura cerca de 10 a 15 dias. Ao 3 dia pós-ingestão, a L3 perde a sua cutícula e atinge a mucosa do intestino delgado anterior, emergindo como L4 ou L5 imatura, cujo sexo já é observável, terminando o seu desenvolvimento até à fase adulta no lume intestinal. A migração deste parasita ao longo do seu ciclo de vida dá-se no sentido posteroanterior, observando-se adultos apenas no duodeno. O período pré patente é de 21 a 22 dias, sendo esta a principal diferença entre este parasita e os parasitas do género *Nematodirus* que afetam os ruminantes, com os quais partilham a subfamília Nematodirinae e semelhanças morfológicas e biológicas, cujo PPP é menor (Audebert, Cassone, et al. 2002).

#### ***Trichostrongylus retortaeformis***

Os parasitas do género *Trichostrongylus*, pertencentes à superfamília Trichostrongyloidea, são maioritariamente assinalados em ruminantes. O nematode *T. retortaeformis* é um dos 10 parasitas de entre os 42 deste género que ocorrem em lagomorfos (Audebert et al. 2003).

Os ovos deste parasita eclodem no ambiente, em cerca de 19h a 24°C (Audebert, Hoste, et al. 2002), não se desenvolvendo caso as temperaturas não ultrapassem os 10°C. Caso sejam expelidos durante o outono, os ovos sobrevivem ao inverno e eclodem na primavera, em contraste com a expulsão durante o inverno, que acaba por resultar na morte dos ovos. As larvas infetantes são resistentes a baixas temperaturas, cessando movimento aos 2,7°C e morrendo a temperaturas menores que 0°C (Anderson 2000). Os estádios

larvares livres, de semelhante morfologia, são L1, L2 e L3. O primeiro dura cerca de dois dias, dando-se a primeira muda às 43h, permanecendo o parasita como L2 entre o 2º e o 4º dias pós-eclosão. A L3 infetante pode ser observada na vegetação, onde se refugia nas zonas menos afetadas pelo clima, vindo a ser ingerida (Anderson 2000). Inicialmente coberta por um invólucro, surge ao 5º dia pós-eclosão e perde a bainha protetora no intestino delgado do hospedeiro às 12h pós-infeção. Ao terceiro dia após a infeção a maioria das L3 evoluiu para L4 embainhadas. É possível observar ao 4º dia o surgimento de larvas L5 imaturas no interior da bainha de L4. Estas são visíveis no intestino delgado até ao 7º dia PI, dando-se o desenvolvimento para adultos sexuais entre o 8º e 9º dias (Audebert, Hoste, et al. 2002). Uma particularidade deste parasita é que apesar de não realizar migração pulmonar, apresenta por vezes no seu ciclo passagens pela mucosa intestinal, não permanecendo ou realizando mais migrações, pensando-se que a presença transitória de um pequeno número de larvas no estroma vilar esteja associada às migrações pulmonares dos ancestrais da subordem Strongylida, que evolutivamente deixaram de ser realizadas, mas cuja memória genética aparentemente permanece (Audebert et al. 2003).

O período pré-patente é de 12 a 13 dias e o período patente de 5,5 meses (Audebert, Hoste, et al. 2002), sendo possível detetar histologicamente enterite aguda e atrofia das vilosidades do intestino delgado, principalmente no duodeno (Audebert et al. 2003).

A prevalência detetada em jovens é maior do que em adultos, sendo a excreção de ovos nas fezes igualmente maior, não havendo relação destes parâmetros com o sexo do hospedeiro (Dudzinski & Mykytowycz 1963; Hobbs et al. 1999; Chylinski et al. 2009). É igualmente maior o comprimento atingido pelos adultos em hospedeiros juvenis (Chylinski et al. 2009).

### ***Passalurus ambiguus***

A oxiurose do coelho bravo é causada pelo nematode *Passalurus ambiguus*, um parasita cosmopolita e muito comum em coelhos e lebres (Anderson 2000). Em fase adulta, o macho atinge cerca de 3-5mm e a fêmea 8-11mm (Mehlhorn 2016). Podem ser observados no cego e no cólon do hospedeiro definitivo, onde completam o seu ciclo biológico. A infeção dá-se por ingestão de ovos em alimentos contaminados ou por autoinfeção, aquando da característica cecotrofia dos lagomorfos. O ciclo de vida deste parasita é, portanto, direto, dando-se a deposição de ovos no intestino grosso ou reto do hospedeiro, os quais se desenvolvem até apresentarem uma larva infetante L3 no seu interior, sendo posteriormente eliminados nas fezes do hospedeiro. É então ingerido este ovo eclodindo a L3 no cego. No cego e cólon, a L3 penetra a mucosa e a parede intestinais, onde continua o seu desenvolvimento para L4, exteriorizando-se para o lúmen intestinal para evoluir para L5 e finalmente a forma adulta, depositando as fêmeas os ovos após a cópula (Mehlhorn 2016). Estes ovos têm a peculiaridade da haplodiploidia, originando machos haploides caso não estejam fertilizados, e fêmeas diploides caso estejam fertilizados (Anderson 2000).

A infecção por *P. ambiguus* não é por sistema muito patogénica, no entanto podem atingir números elevados de parasitas num só hospedeiro, podendo este conseqüentemente apresentar um quadro clínico grave, tendo inclusivamente sido reportados casos fatais em coelhos jovens (Rinaldi et al. 2007). O quadro clínico, pouco específico, pode incluir prurido anal, diarreia sanguinolenta, úlceras e perda de peso (Mehlhorn 2016), e é mais notado nos animais jovens por ser nestes que a excreção de oocistos é maior (Hobbs et al. 1999). O PPP é longo, podendo alcançar as 12 semanas, sendo o PP de 1-2 meses (Mehlhorn 2016)

### ***Trichuris leporis***

É um nematode da família Trichuridae, raramente encontrada em coelhos selvagens. Os parasitas do género *Trichuris* estudados totalizam à data cerca de 70 espécies, e são altamente prevalentes globalmente, estando estudados mais de 70 hospedeiros para as diferentes espécies (Anderson 2000; Mehlhorn 2016).

A infecção dá-se de forma direta por ingestão de ovos contendo larvas infetantes, os quais eclodem no intestino delgado do hospedeiro. As formas larvares, após a eclosão dos ovos, realizam uma expedita migração para o intestino grosso, onde invadem a mucosa do colon e do cego para concluírem o seu desenvolvimento. Nesta localização, alimentam-se do sangue do hospedeiro, sofrem 4 mudas e atingem dimensões máximas de cerca de 30mm como formas adultas (Anderson 2000). Os ovos expelidos nas fezes são não embrionados, desenvolvendo larvas no seu interior até atingirem a fase infetante, contendo L1 (Mehlhorn 2016)

Em termos clínicos, os sinais expectáveis estão relacionados com a carga parasitária e são principalmente consequência da invasão da mucosa intestinal pelos parasitas. Assim, o animal pode encontrar-se anémico, diarreico, por vezes apresentando sangue nas fezes, com perda de peso e anoréxico, sendo possível observar edema na parede luminal do intestino grosso. O PPP da espécie é ainda pouco específico, no entanto é possível induzir, a partir dos estudos relativos às restantes espécies do seu género, que geralmente será de 1 a 2 semanas, podendo ainda assim ocorrer aquando das migrações larvares caso estejamos perante uma infecção grave (Mehlhorn 2016).

### ***Eimeria* spp.**

As coccidioses originam infeções latentes em toda a população de coelho-bravo, desenvolvendo patologia principalmente quando o estado imunitário é alterado. Esta situação dá-se em casos de stress crónico, como o observado nas competições entre animais subadultos, que despendem também elevadas quantidades de energia em atividades territoriais agressivas, acabando por sofrer perdas diretas de peso e indiretas por aumento de suscetibilidade a doenças oportunistas como a coccidiose. No caso de *O. cuniculus*, apenas foi detetada a coccidiose por parasitas do género *Eimeria* (Duszynsk & Couch 2013).

No coelho-bravo da Península Ibérica estão descritos os seguintes agentes: *Eimeria coecicola*, *E. perforans*, *E. media*, *E. magna*, *E. irresidua* e *E. flavescens*, sendo apenas esta

última considerada na literatura como altamente patogénica (Silva et al. 2015). A classificação destes parasitas em apatogénicos a altamente patogénicos é baseada em parâmetros como a perda de peso e diarreia que causam, e as suas taxas de mortalidade. No seu exponente patogénico máximo, causam uma doença particularmente nefasta para o hospedeiro (Duszynski & Couch 2013), provocando perdas de peso e de condição corporal por vezes superiores àquelas causadas pela Mixomatose, chegando mesmo a atingir taxas de mortalidade de 20% na França, onde ultrapassaram as da DHV (Silva et al. 2015).

Relativamente à Península Ibérica, à data, apenas Silva et al. (2015) procurou discriminar as espécies presentes e taxas de excreção médias de oocistos no coelho europeu, nas regiões da Serra da Estrela e do Sudoeste Alentejano e Costa Vicentina, tendo obtido 17.03 +/- 27.72 e 57.61 +/- 28.07 oocistos por grama de fezes (OoPG), respetivamente.

No que diz respeito ao ciclo de vida, as coccídias são espécies monóxenas, intracelulares obrigatórias, com elevada especificidade de hospedeiro (Bowman et al. 2014). O ciclo de vida dos parasitas do género *Eimeria* tem como padrão 3 fases sequenciais: esporogonia, no ambiente, e esquizogonia e gametogonia, no hospedeiro. O oocisto não esporulado é excretado nas fezes, sofrendo esporulação no exterior, o que corresponde à esporogonia. O animal ingere o oocisto esporulado (contendo quatro esporocistos, cada um com dois esporozoítos), tornando-se infetado, e é iniciada a migração anteroposterior ao longo do trato gastrointestinal, ocorrendo a eclosão dos esporozoítos no intestino delgado. Dá-se então início à esquizogonia, penetrando os esporozoítos a parede intestinal, onde originam um trofozoíto com um vacúolo parasitóforo. Nesta mesma localização, o trofozoíto alimenta-se, sofrendo o núcleo divisões exponenciais, originando o esquizonte, o qual por sua vez se desenvolve e, após rotura, origina os merozoítos. Estes poderão originar uma nova geração de esquizontes, migrando, ou tornam-se gamontes com múltiplos gâmetas flagelados masculinos (microgâmetas) ou femininos (macrogâmetas), ocorrendo então a fertilização que resulta na formação do oocisto, que após eliminação nas fezes para o exterior irá reiniciar o ciclo biológico (Duszynski & Couch 2013; Bowman et al. 2014).

A gravidade da infeção difere consoante a carga parasitária, a qual é limitada pela incapacidade destes parasitas se multiplicarem ilimitadamente, e por isso pela quantidade de oocistos ingeridos no ambiente e pela imunidade do hospedeiro. Assim, pode dizer-se que as coccidioses são doenças autolimitantes, cujas características variam consoante o sistema hospedeiro-parasita. A destruição extensa do epitélio intestinal, que é comum a qualquer coccidiose, pode estar relacionada com atrofia das vilosidades e causar síndrome de má-absorção, ou com enterite exsudativa e colite por erosão ou até ulceração, tomando um quadro de anemia, desidratação e hipoproteinémia. Estas condições poderão potenciar infeções bacterianas secundárias que agravam o quadro, podendo inclusive tornar-se fatal. O PPP é variável consoante a espécie infetante, e o período patente é de cerca de 2 a 5 semanas (Mehlhorn 2016).

***E. perforans*** - O PPP é de 4-6 dias. Considerada não-patogénica a levemente patogénica (Duszynski & Couch 2013).

***E. magna*** (também conhecida como *E. elongata*) - Uma das espécies mais patogénicas. O PPP tem a duração de 7-9 dias (Mehlhorn 2016)

***E. flavescens*** - Esporulação em 38h ou menos, a 27°C. Mais prevalente em animais com menos de 3 meses de idade. PPP e PP variam consoante número de parasitas e peso do hospedeiro. Merontes e esquizontes presentes no tecido epitelial do ceco e cólon (Duszynski & Couch 2013). Esta é a espécie de *Eimeria* com maior patogénica que infecta o coelho-bravo (Silva et al.2015).

***E. coecicola*** - Altamente prevalentes em coelhos selvagens; moderadamente patogénicas. A esporulação é exógena, ao 3º dia a 22°C. A esporogonia dá-se no epitélio intestinal, sendo observáveis esporozoítos no epitélio vilar do intestino delgado, e a merogonia dá-se nos tecidos linfoides do trato gastrointestinal. Esta é uma das poucas espécies do seu género que divide o seu ciclo de vida em dois locais. O período pré-patente da *E. coecicola* é de 8 a 9 dias e o período patente de 7 a 9 dias (Duszynski & Couch 2013).

***E. media* e *E. irresidua*** - Nestas espécies, apenas a merogonia ocorre no epitélio, sendo que a gamogonia, fertilização e formação de oocistos ocorre no subepitélio, no entanto sempre na mesma região do trato gastrointestinal. Os PPP são de 7-9 dias e <16 dias, e as patogénicas moderadas e leves, respetivamente, para *E. media* e *E. irresidua* (Duszynski & Couch 2013).

#### **2.1.10. Medicina preventiva**

A medicina preventiva nas populações selvagens de coelho em Portugal inclui, contextualizado no plano de ação do INIAV decorrente do Despacho 4757/2017, o projeto do Grupo de Trabalho +Coelho, no qual se tem realizado a vacinação contra a Mixomatose e o vírus da DHV e monitorização destas doenças, nas populações de leporídeos em Portugal (INIAV 2019).

A profilaxia relativa à Mixomatose baseia-se numa vacina atenuada contendo a estirpe SG33, a qual confere uma proteção de curta duração, suspeitando-se até que causa imunossupressão em jovens coelhos (Guitton et al. 2008). O sucesso da vacinação é condicionado por fatores do hospedeiro (principalmente a condição corporal), estando estimada em 81% de animais com seroconversão positiva após a vacinação (Cabezas et al. 2006). A transmissão passiva de anticorpos da progenitora para as crias confere imunidade, embora igualmente curta. A imunocompetência dos animais é quantificada de acordo com a seropositividade que apresentam de anticorpos contra o vírus, já que aqueles que recuperam, o fazem através de imunidade celular. Estima-se que a vacinação na população selvagem confira um aumento de probabilidade de sobrevivência de 1.8x (Guitton et al. 2008).

A vacinação contra o VDHV utiliza uma versão recombinante da proteína estrutural VP60 (Abrantes et al. 2012). Após o surgimento da estirpe VDHV2, rapidamente foi desenvolvida uma nova vacina, que tem tido eficácia em imunizar populações não endêmicas, tendo, no entanto, eficácia diminuída em populações que já tenham contactado com o VDHV2 (Carvalho et al. 2017). Na população adulta, a vacinação contra o VDHV não parece ter efeito na mortalidade, dada a exposição prévia ao vírus e a seropositividade dos animais aquando da vacinação. (Calvete et al. 2004). A intensidade da resposta imunitária conferida pelas vacinas contra o VDHV e a Mixomatose será tanto maior quanto melhor a condição corporal do animal aquando da administração da vacina, sendo a seroconversão após a vacinação de cerca de 84% (Cabezas et al. 2006). A vacinação na população selvagem não é considerada viável, quer do ponto de vista prático, quer do ponto de vista económico, por esta ainda não ser suficientemente acessível e conferir imunidade não superior a 1 ano (Abrantes et al. 2012). Adicionalmente, o método de vacinação na população selvagem implica captura e posterior libertação, a qual se crê estar associada a um aumento na mortalidade e na população juvenil e subadulta nos 7 dias subsequentes à vacinação (Calvete et al. 2004; Cabezas et al. 2006).

Têm sido estudadas outras formas mais eficazes de imunizar estas populações, procurando criar vacinas bivalentes, por exemplo utilizando um vírus recombinante da Mixomatose incorporado com material genético codificante da proteína estrutural do VDHV (Cooke 2008), bem como vacinas de via oral incorporadas em alimento (Mikschofsky et al. 2009).

### **3. Estudo epidemiológico e fisiológico longitudinal do parasitismo gastrointestinal numa população de coelho bravo no Ribatejo**

#### **3.1. Objetivos do estudo**

Face ao drástico declínio da população de coelho-bravo na Península Ibérica, e dado o seu importante estatuto ecológico, urge quantificar e qualificar a influência de diversos fatores na mesma, bem como acompanhar a sua evolução demográfica, por forma a implementar métodos eficientes de conservação desta espécie. A escassez de dados epidemiológicos para *O. c. algirus*, em particular relativos ao parasitismo gastrointestinal e a sua influência no hospedeiro, e à influência do sexo e idade na intensidade e prevalência do parasitismo, representa uma lacuna na informação necessária à conservação desta espécie, que deve ser preenchida o mais rapidamente possível.

No presente estudo os fatores estudados na população de coelho-bravo foram o parasitismo gastrointestinal, a par da fisiologia, hematologia e biometrias. O objetivo deste estudo foi monitorizar os parâmetros demográficos nesta população, relacionando-os com a prevalência e excreção parasitárias, bem como eventualmente quantificar a relação da mortalidade com os diversos parâmetros estudados para a população, entre maio de 2018 e maio de 2019.

O local de estudo foi a Companhia das Lezírias, no Ribatejo, onde as populações de coelho-bravo estão extensamente estudadas e acompanhadas, servindo como exemplo paradigmático de habitat ideal, embora de momento estas atinjam apenas abundâncias baixas a médias.

#### **3.2. Material e Métodos**

##### **3.2.1. Localização geográfica**

O estudo foi desenvolvido na Companhia das Lezírias, concretamente na área da Silha do Matias (38°50'47.9"N 8°51'43.4"W), localizada na região do Ribatejo, em Samora Correia, Ribatejo, Portugal (Figura 4).



**Figura 4- Mapa de Portugal continental (Google Maps) assinalando a localização do local de estudo, a Companhia das Lezírias, SA.**

A altitude média da região de Samora Correia é de 25m, variando entre 219m e -2m (Direção-Geral do Território c2017). De acordo com os índices climáticos, o clima desta região pode ser considerado como Mediterrânico de verão quente, “Csa” segundo a classificação Köppen e Geiger, sendo um clima quente e temperado com verões secos. O período seco nesta região tem uma duração extensa, iniciando-se em maio-junho e prolongando-se até setembro, sendo a pluviosidade significativamente menor no verão comparativamente ao inverno. No distrito de Santarém, a temperatura média anual é de 15,9°C, com uma temperatura média mínima de 9,6°C atingida em janeiro, e máxima de 22,7°C em agosto, e a precipitação média anual é de 58,0mm atingindo um máximo de 104,1mm em média no mês de dezembro e um mínimo de 6,2mm em média no mês de agosto (IPMA c2019).

A vegetação da região estudada é composta por bosques de *Quercus suber* e *Pinus* spp. em solo arenoso fixado por uma estrutura arbustiva de tojal e urze, composta principalmente de arbusto espinhoso *Ulex australis* subespécie *Welwitschianus* ou *Ulex europaeus* subespécie *Latebracteatus*, em padrão de mosaico (Figura 5). Este padrão inclui regiões intercaladas de solos arenosos em aberto, profundos e oligotróficos, com baixa capacidade de retenção de água (Correia e Mexia 2011). Na Companhia das Lezírias destacam-se, pela sua importância ecológica, as seguintes espécies faunísticas: Bútio-Vespeiro (*Pernis apivorus*), Açor (*Accipiter gentilis*), Águia-de-Bonelli (*Aquila fasciata*), Ógea (*Falco subbuteo*), Noitibó-cinzento (*Caprimulgus europaeus*), Noitibó-de-nuca-

vermelha (*Caprimulgus ruficollis*), Toirão (*Mustela putorius*), Gato-bravo (*Felis silvestris*), Rato-de-Cabrera (*Microtus cabrerae*) (Companhia das Lezírias [date unknown]).



Figura 5 Exemplos da vegetação e solo observados na área de estudo (Fotografias originais).

Na área estudada, as populações de coelho-bravo atingiam no passado números significativamente abundantes (Figura 6). Ainda assim, face à disparidade entre regiões da Companhia no que toca a diversidade de espécies e abundância do coelho, foram criados corredores ecológicos de vegetação para conectar áreas pouco diversificadas com áreas com grande variedade de espécies, em 2007, bem como um programa para aumentar a abundância de coelhos nas regiões onde havia escassez, em 2009. Este programa incluiu a monitorização das populações, a restrição da caça e o repovoamento, criando cercados de aclimação, em 2009. Presumivelmente devido a estas medidas, o impacto sentido pelo surgimento da nova estirpe do VDHV foi não só menor como a longo prazo minimizado, tendo sido possível recuperar grande parte das populações (Gonçalves et al. 2014).

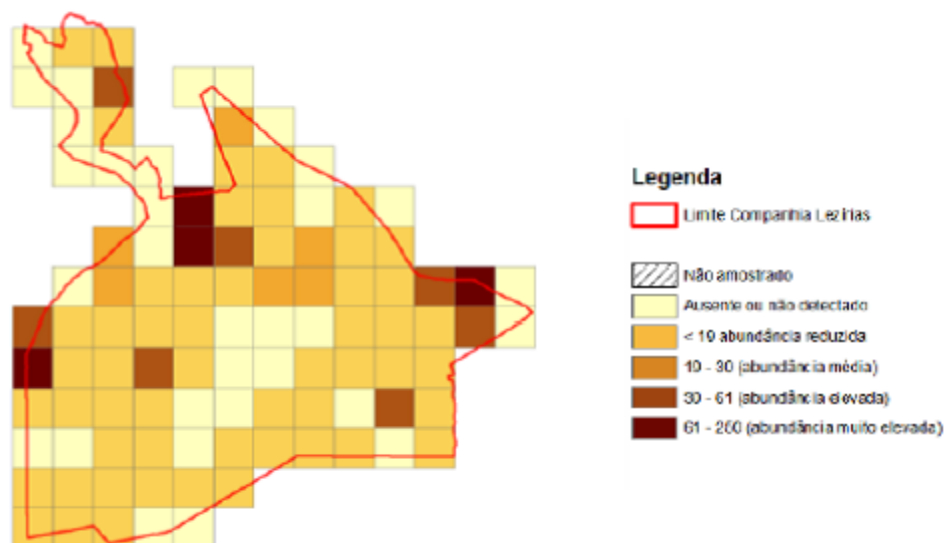


Figura 6 - Distribuição e abundância do coelho-bravo em 2009 (Gonçalves et al. 2014).

### 3.2.2. Implementação do estudo

O modelo de estudo aqui implementado foi o epidemiológico observacional de coorte, em modo prospetivo, indicado para averiguar a influência de parâmetros numa população ao longo do tempo – facilitado pela elevada dinâmica populacional e flutuações demográficas espaçadas no tempo, a facilidade de acesso a animais capturados vivos e o longo registo demográfico na região estudada.

Na região da Silha do Matias, em abril de 2018, foram colocadas 53 armadilhas Tomahawk™ (Figura 7), constituídas por uma caixa metálica em rede com um pedal que ativa uma porta de fecho rápido por mola. Estas foram distribuídas por uma área de 13 hectares, procurando localizá-las próximas de coelheiras de dimensões consideráveis (Figura 8).



**Figura 7 - Localização da área de estudo e distribuição das 53 armadilhas (Santos e Alves 2019).**

As caixas-armadilha foram ativadas com um isco de cenoura fresca cortada em pedaços antes do pôr-do-sol e vistoriadas em duas rondas: a primeira pelas 22h e a segunda cerca uma hora após o nascer do sol, na qual eram inativadas caso se encontrassem vazias. Este processo repetia-se diariamente em campanhas com a duração de 4 ou 5 dias, com intervalos de 4 semanas (até outubro de 2018) ou 6 semanas (após outubro de 2018).



**Figura 8 - Armadilha Tomahawk™ ativada e com isco, equipada com pedal-gatilho e porta de fecho rápido por ação de mola, situada a cerca de 2 metros de uma toca de coelho-bravo (fotografias originais).**

Sempre que era capturado um coelho-bravo durante uma ronda, a armadilha em causa era coberta por uma manta de tecido opaco, escuro, por forma a resguardar o animal de potenciais predadores e minimizar o estímulo stressante associado à captura. Terminada a ronda, retornava-se à armadilha bem-sucedida, munidos de um saco de tecido preto igualmente opaco, luvas descartáveis e luvas de campo. A armadilha era colocada na vertical por forma a dificultar a fuga do animal, e manipulada unicamente por intermédio das luvas de campo, para que o odor humano não constituísse um estímulo negativo para os coelhos selvagens por capturar (Figura 9).

O animal capturado era então colocado no saco e transportado ao local de colheita de amostras.



**Figura 9- *Oryctolagus cuniculus algirus* capturado em armadilha, a qual foi resguardada de agressões ambientais e predatórias e colocada na vertical para extração do animal (fotografia original).**

Todos os coelhos-bravos (*Oryctolagus cuniculus algirus*) encontrados nas armadilhas foram sujeitos sequencialmente e no local de colheita à recolha de zaragatoas rectal, vaginal, oronasal e palpebral, bem como de sangue venoso, acondicionado em tubos com EDTA e em tubos de coagulação. Foram também registados o peso em grama e o comprimento total, o comprimento da orelha e o do tarso, em milímetros; e colhidas amostras de pelo e uma biópsia de orelha (esta última apenas na primeira captura de cada indivíduo). Foi utilizada a técnica de captura-marcação-recaptura, identificando-se todos os coelhos-bravos capturados com *chip*, para posterior leitura e registo se recapturados e acompanhamento do estado dos indivíduos. Em certos animais capturados não foi possível totalizar este protocolo, no caso das análises hematológicas por colheita insuficiente de sangue por manifestação de stress derivada da captura e manipulação, e no caso das análises coprológicas por ausência de fezes no solo da armadilha. Eram registados em ficha de captura (Anexo 1) os dados referentes ao número de amostras colhidas, sexo, idade, biometrias e número de chip de cada animal capturado.

Entre maio de 2018 e maio de 2019 realizaram-se 121 capturas de 50 coelhos-bravos, dois dos quais falecidos na armadilha e um encontrado morto no campo.

Foram realizados os protocolos de sedimentação e flutuação em 101 amostras fecais de 47 coelhos bravos, e de McMaster em 84 amostras fecais de 43 animais. Relativamente às amostras sanguíneas, estas totalizaram 51, originárias de 39 coelhos (Tabela 2).

**Tabela 2- Proporção de sexo e classe etária dos indivíduos sujeitos a análises coprológica e hematológica.**

Tipo de análise	Nº amostras de Fêmeas	Nº amostras de Machos	Total
Coprológica	58 adultas, 4 juvenis, de 31 indivíduos	27 adultos 12 juvenis, de 16 indivíduos	101 amostras 47 animais
Hematológica	31 adultas, 3 juvenis, de 26 indivíduos	12 adultos, 5 juvenis, de 15 indivíduos	51 amostras 41 animais

### 3.2.3. Determinação da idade

A data de nascimento dos coelhos que pesavam menos de 900g foi estimada utilizando a curva de crescimento estimada por Ferreira e Ferreira (2014) para a subespécie *O. c. algirus*. Coelhos juvenis foram também identificados utilizando o método descrito por

Watson e Tyndale-Biscoe (1953), procurando distinguir no tarso a descontinuidade característica de coelhos juvenis.

#### **3.2.4. Análise de amostras fecais**

Todas as fezes encontradas no solo da armadilha que tenha tido sucesso em capturar um coelho foram contadas e colocadas em sacos plásticos herméticos, os quais foram posteriormente refrigerados.

Uma vez no LPDP da FMV-ULisboa, os sacos contendo amostras foram pesados (admitindo um erro de 0,05g, e subtraindo-se o peso estimado do saco) e homogeneizados com recurso a varetas de vidro. Caso a amostra fosse superior a 2g, era então realizado na íntegra o protocolo de análise quantitativa e qualitativa, incluindo os métodos de flutuação, sedimentação e McMaster. Primeiramente, eram diluídos 2g de fezes, previamente homogeneizadas, em 28ml de solução saturada de glucose num recipiente de plástico. O conteúdo desse recipiente, após homogeneização, era filtrado para um segundo recipiente, igualmente de plástico, procurando verter a totalidade do líquido e sedimento. O filtrado era então vertido para o interior da câmara McMaster, para análise microscópica, a qual é de carácter quantitativo (Henriksen & Aagaard 1976). O restante líquido era colocado num tubo de ensaio, procurando completar o volume do mesmo até cobrir o topo, por forma a criar uma superfície de tensão. Nesta superfície era aposta uma lamela 20mm x 20mm, em contacto direto com o líquido (Figura 10). Após um período mínimo de 10 minutos, a lamela era cuidadosamente retirada e montada numa lâmina 80mm x 20mm, para posterior observação ao microscópio ótico. Esta lâmina corresponde ao método de flutuação baseado em Willis (1921), tendo, no entanto, sido utilizada solução de glucose saturada (Thienpoint et al. 1979), e permitiu realizar uma análise qualitativa dos ovos e oocistos presentes nas fezes. Por último, o sobrenadante do tubo de ensaio era descartado, pipetando-se duas gotas do sedimento para uma lâmina, como dita o método de sedimentação simples de Hoffman-Pons-Janer (Hoffman et al. (1934), de Santana et al. 2015), a qual era corada com recurso a duas gotas de azul de metileno, devidamente homogeneizadas com o sedimento. Estava assim concluída a técnica de sedimentação e pronta para análise microscópica qualitativa.



**Figura 10 - Estação de trabalho de análise coprológica no LPDP da FMV-ULisboa (original).**

Legenda: À esquerda, vários tubos de ensaio contendo solução homogeneizada de fezes com solução saturada de glucose, com lamelas apostas no topo, em contacto com o líquido. À direita, *ziplocs* com as amostras de fezes.

A identificação dos ovos encontrados nas fezes foi feita com base nas descrições em Thienpont et al. (1979).

### **3.2.5. Análise Hematológica**

A colheita de sangue era efetuada por punção, com recurso a seringa de 3ml e agulha 25G, a partir da veia safena ou da veia cefálica. Eram colhidos aproximadamente 0,25 ml de sangue para um tubo EDTA, e 1-3 ml para tubos de coagulação.

O tubo EDTA era o utilizado nos procedimentos para o cálculo do hematócrito e da concentração de hemoglobina, bem como nas contagens celulares absolutas e relativas.

Para realização do microhematócrito, o tubo com EDTA era inicialmente agitado suavemente por forma a homogeneizar o sangue no interior. A amostra era colocada no interior de dois tubos de hematócrito, sempre que a dimensão da amostra o permitisse. Para evitar a saída de sangue aquando da centrifugação que se seguia, estes tubos eram vedados com plasticina. Eram atribuídas etiquetas a cada tubo, correspondentes ao número de captura constante na ficha de captura do animal.

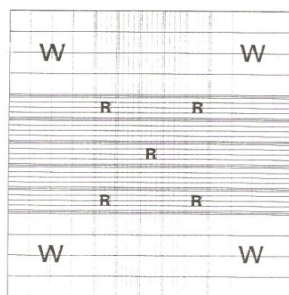
Procedia-se então à centrifugação a 1500 g durante 10 minutos, estando os tubos de microhematócrito no interior de tubos da centrifugadora, protegidos no fundo com algodão.

Terminada a centrifugação, eram medidos, com recurso a um paquímetro (ou craveira), o comprimento total do conteúdo de cada tubo de microhematócrito, bem como o comprimento correspondente à porção celular do sangue, procurando excluir a porção plaquetária (geralmente uma fina camada de cor esbranquiçada entre a porção celular, vermelha, e o soro, transparente), aproveitando para observar a cor do restante,

correspondente ao soro (registrando as medições e, se aplicável, as alterações observadas). O valor medido para a parcela celular era dividido pelo total do conteúdo do tubo, obtendo-se um valor percentual correspondente ao valor do hematócrito (Von 1975).

A contagem absoluta de eritrócitos e leucócitos era feita com recurso à mesma amostra, previamente agitada. Num tubo de Eppendorf eram colocados 20 µl de sangue e 480 µl de solução de Natt e Herrick, homogeneizando suavemente a mistura, que era então repousada por 15 minutos. Da solução resultante, eram retirados 20 µl, para serem diluídos e homogeneizados em 140 µl de solução de Natt e Herrick num outro tubo, por forma a obter uma proporção final de 1:200. O hemocítmetro (Neubauer chamber, Knittel Gläser, Braunschweig, Germany) era então preenchido com a solução, deixando repousar por 2 minutos (Melillo 2013).

A câmara de Neubauer contém duas divisórias iguais à representada na figura 11. Para cada compartimento, eram contadas todas as células nucleadas nos quatro quadrados representados por “W”, obtendo-se a contagem de leucócitos observáveis na ampliação de 400 x. Os números finais de leucócitos por cada compartimento eram adicionados e depois divididos por 4, obtendo-se um valor absoluto de leucócitos  $\times 10^6$  /ml ou  $\times 10^9$  /L. Para contagem de eritrócitos, eram contabilizados todos os glóbulos vermelhos nos 5 quadrados designados “R”, recorrendo à ampliação 400x e óleo de imersão, igualmente para cada compartimento. As contagens obtidas eram também adicionadas e posteriormente divididas por 200, obtendo-se um valor absoluto de eritrócitos  $\times 10^9$  /ml ou  $\times 10^{12}$  /L (Absher 1973).



**Figura 11 - Ilustração dos diferentes campos da câmara de Neubauer, designados por “W” de *White Blood Cells* (leucócitos), e “R” de *Red Blood Cells* (eritrócitos) (adaptado de Absher 1973).**

A contagem diferencial para obtenção da fórmula leucocitária era então levada a cabo, aproveitando o conteúdo do tubo de microhematócrito, partindo este tubo para colocar uma gota de sangue numa lâmina. Enquanto a gota estava fresca, utilizava-se uma lamela para realizar o esfregaço da gota na lâmina, espalhando-a uniformemente com suavidade para evitar lise celular. A fixação era feita por secagem ao ar e aplicação de metanol, repousando 1 minuto, sendo então a lâmina corada com Giemsa, igualmente por 1 minuto. Depois de

etiquetada com o número de captura, era finalmente observada ao microscópio ótico em ampliação 1000x com óleo de imersão (Barcia 2007; Melillo 2007; Marshall 2008).

Contavam-se 200 células leucocitárias no total, registando de entre estas os diversos tipos de células e respetivas quantidades. A distinção entre as diferentes células era feita utilizando as descrições constantes em Marshall (2008). Para cada tipo de célula (neutrófilo, basófilo, eosinófilo, linfócito e monócito) o total era dividido por 2, por forma a obter um valor percentual.

Estes procedimentos laboratoriais eram realizados no alojamento da Pequena Companhia, sito na Companhia das Lezírias, S.A., ou no LPDP da FMV-ULisboa.

Para obter a concentração de hemoglobina para cada amostra, colocaram-se 20 µl de sangue, retirados do tubo de EDTA, num tubo de eppendorf, ao qual eram adicionados 980 µl de uma solução com Hidróxido de Sódio (NaHO) 0,1 M e 2,5% de Triton™ X-100 (agente hemolítico). 200 µl da solução resultante eram diluídos novamente em 600 µl da solução de NaOH 0,1M com 2,5% de Triton™ X-100, sendo a solução final etiquetada e congelada para conservação e posterior continuação do protocolo.

Para terminar o procedimento, a solução era descongelada, e calibrado o espectrofotómetro com o branco, neste caso a solução de NaOH 0,1M e Triton™ X-100 2,5%. Finalmente era lida a absorvância no espectrofotómetro a 580nm, correspondendo o valor final de concentração de Hemoglobina (g/L) à multiplicação do valor de absorvância por 34,96 (Zander et al. 1984).

Todas as medições, cálculos e resultados eram registados na ficha de resultados laboratoriais (Anexo 2).

### **3.2.6. Avaliação do trato gastrointestinal de cadáveres**

Ao longo do período de estudo, foram encontrados três cadáveres de coelho-bravo, dois no interior de armadilhas, tendo falecido por predação, e um terceiro no terreno. Os três cadáveres foram submetidos a ensaios virológicos de PCR em tempo-real (RT-PCR) para deteção de VDHV e de VDHV2, bem como exame bacteriológico para deteção de bactérias patogénicas em anaerobiose. Estas análises foram realizadas nos Laboratórios de Virologia, Bacteriologia e Micologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV) e os respetivos relatórios encontram-se no Anexo 3.

Os tratos gastrointestinais dos três cadáveres foram recolhidos e conservados a 4-5°C, sendo posteriormente analisados no LPDP da FMV-ULisboa. O procedimento iniciou-se para cada animal com o isolamento do estômago, do intestino delgado e do intestino grosso, delimitados a jusante pelos esfíncteres duodenal e cecal, respetivamente, e colocados em três tabuleiros separados.

Cada porção era então seccionada longitudinalmente, isto é, pelo eixo maior do estômago e ao comprimento do intestino, procurando observar sinais patológicos na mucosa

gastrointestinal, como hemorragia, alterações de coloração, tumefação ou nódulos. O conteúdo foi observado para alterações de consistência, esperando encontrar-se cecotrofos e fezes no intestino grosso, bem como conteúdo estomacal alimentar ou digerido (Feldman & Seely 1988).

Após esta avaliação, cada tabuleiro foi preenchido com cerca de 1cm de altura de água, por forma a cobrir o conteúdo do mesmo, e feita a lavagem do trato gastrointestinal manualmente, para posterior observação num tabuleiro separado.

Nesse segundo tabuleiro, a mucosa gastrointestinal era avaliada pormenorizadamente, procurando parasitas alojados na mesma. Após um intervalo de cerca de 10 minutos, ao verificar que os detritos das fezes no primeiro tabuleiro tinham assentado, era avaliado com recurso a pinça e estilete o conteúdo flutuante e sedimentado. Quaisquer objetos cuja dimensão, forma e cor fossem compatíveis com as de um helminte parasita gastrointestinal adulto foram colocados num frasco de 60ml de volume contendo cerca de 30ml em álcool a 70%. Após esta primeira aferição, o sobrenadante de água era descartado, conservando apenas o conteúdo sedimentado. Este era então novamente avaliado em profundidade, mais uma vez conservando no frasco com álcool quaisquer objetos que aparentassem macroscopicamente ser parasitas gastrointestinais. Este processo foi repetido até que a análise a todo o conteúdo estivesse completa e todos os potenciais parasitas gastrointestinais fossem encontrados e conservados em álcool a 70% (Szkucik et al. 2014). Todos os objetos recolhidos foram observados à lupa, descartando-se os que não correspondessem a helmintes parasitas gastrointestinais, e identificando a espécie ou género dos que correspondessem, com recurso a descrições e registos fotográficos em Bautista et al. (1999).

### **3.2.7. Análise estatística e software**

Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados com recurso ao software OfficeExcel para cálculo de médias e intervalos de confiança em dados quantitativos, e ao website de computação estatística vassarstats.com em dados de frequência ou proporção. Para relacionar a taxa de excreção parasitária com a condição corporal, esta última foi calculada dividindo o peso pelo comprimento do tarso dos indivíduos, considerando-se ideal (2,5 a 3,5 numa escala de 1-5) quando está entre 16 e 23 (Sweet et al. 2013).

Para comparar a frequência de infeção (prevalência) entre machos e fêmeas, juvenis e adultos e entre grupos e meses, foi realizado o teste de chi-quadrado de Pearson em tabela de contingência 2x2, quando todos os valores de frequência expectável foram >5. Caso contrário, era realizado o teste de probabilidade exata de Fisher, cujo princípio e execução são igualmente aplicáveis. O teste de chi-quadrado resulta num valor de  $\chi^2$ , chi-quadrado, o qual será enquadrado no gráfico de distribuição da significância para o número de graus de

liberdade das proporções analisadas. O grau de liberdade para uma tabela de contingência 2x2 será o a soma das subtrações do número de colunas por 1 ( $c-1$ ) e do número de linhas por 1 ( $l-1$ ), que neste caso é 1. Nesse gráfico, o valor de chi-quadrado é convertido para um valor de probabilidade  $p$ , o qual será significativo se menor que 0,05, podendo afirmar-se nesse caso, com 95% de confiança, que a variação nas proporções não seria igual caso as amostras fossem aleatórias.

Para os parâmetros quantificáveis, os hematológicos e a excreção parasitária, fez-se a comparação entre faixas etárias, sexo e meses com recurso ao teste ANOVA (*Analysis of Variance*) unilateral, utilizando-se o teste de Tukey na análise entre cada dois conjuntos de amostras, caso se revelasse variabilidade significativa entre todos os conjuntos. Estes testes resultam num valor de  $F$ , convertido da mesma forma para um valor de probabilidade de  $p$  através da distribuição da significância para os graus de liberdade dos conjuntos (calculados somando as subtrações do número de amostras em cada coluna por 1). O valor de  $p$  será significativo se menor que 0,05, podendo afirmar-se com 95% de confiança que a variação observada entre os conjuntos de dados não se dá ao acaso.

Todos os testes estatísticos de significância foram realizados por computação dos dados no website Vassarstats.com.

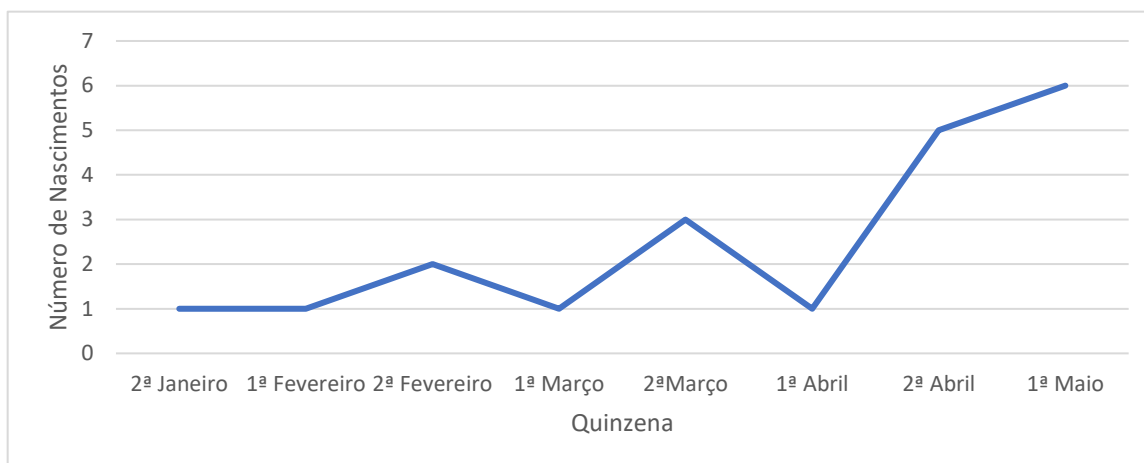
### **3.3. Resultados e Discussão**

No total foram capturados cinquenta coelhos-bravos, dos quais 32 eram fêmeas e 18 machos. As fêmeas correspondem a 75 do total de capturas, enquanto os machos correspondem às restantes 46, significando isto que ambos os sexos foram recapturados um semelhante número médio de vezes (as fêmeas 2,34 vezes, os machos 2,56 vezes). A ligeira diferença pode dever-se ao já citado facto de os machos rotineiramente atribuírem mais 30% do seu tempo a atividades no exterior da coelheira e terem um raio de atividade maior comparativamente às fêmeas (Soriguer y Palacios 1994, Devillard et al. 2008). A aparentemente paradoxal desproporção no número de indivíduos capturados de cada sexo pode ser explicada pela estrutura social das coelheiras, a qual consiste em cerca de quatro fêmeas e apenas um ou dois machos, sendo um dominante (Bautista et al. 2008).

Ao estimar a data de nascimento de 20 dos juvenis capturados, observou-se um pico nos nascimentos na segunda quinzena de abril e na primeira quinzena de maio (Gráfico 1). Coelhos nascidos no início da época reprodutiva teriam, à data das análises, pesos superiores a 800g, pelo que estará subestimado o número de nascimentos anteriores a janeiro. Entre setembro de 2018 e maio de 2019 foi capturado apenas um coelho juvenil, que se estima ter nascido na segunda quinzena de fevereiro, pelo que para o outono de 2018 foi igualmente impossível estimar a taxa de nascimentos. O período de gestação desta espécie é de cerca de 34 dias, pelo que pode estimar-se que a época reprodutiva teve início em dezembro ou anteriormente. A época estimada está enquadrada no esperado em Portugal, entre novembro

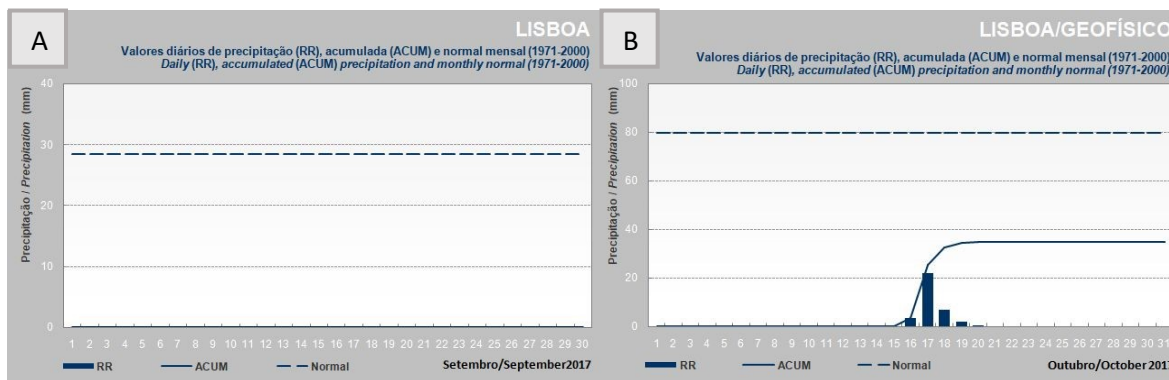
e junho, com um pico em março ou abril (Gonçalves et al. 2002). Os resultados obtidos estão de acordo com estudos que mencionam a influência da precipitação e disponibilidade de alimento na reprodução (Soriguer & Palacios 1994), que possivelmente terá atrasado o pico reprodutivo cerca de um mês por escassez de precipitação principalmente em setembro e outubro de 2017 (Gráfico 2).

**Gráfico 1- Quinzena de nascimento dos coelhos juvenis capturados entre maio de 2018 e maio de 2019.**



**Gráfico 2 - Precipitação (mm) em setembro (A) e outubro (B) de 2017 (IPMA c2019).**

Observar a ausência total de precipitação no mês de setembro, e a escassez relativa à média na zona (linha descontinua horizontal superior) em outubro.



### Análises coprológicas

Foram analisadas 101 amostras coprológicas no total, realizando-se no seu conjunto 202 análises qualitativas (flutuação e sedimentação) e 85 análises quantitativas (McMaster)

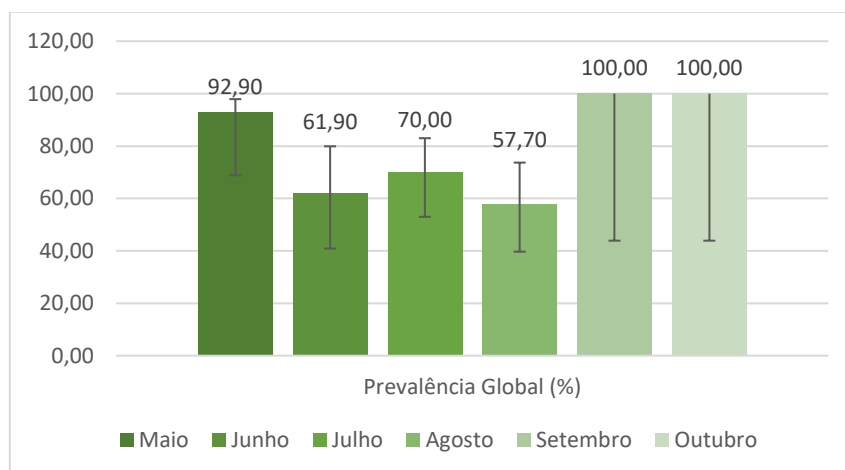
Foi obtida uma prevalência parasitária global de 70,3% (IC<sub>95</sub> 60,8-78,3%), dividindo-se entre nematodes (oxiurídeos, estrogilídeos gastrointestinais e *Trichuris leporis*), cestodes (anoplocefalídeos) e protozoários (coccídias).

A prevalência global atingiu os 92,9% (IC<sub>95</sub> 68,5-98,7%) em maio de 2018 e 100% em setembro e outubro (ambos com IC<sub>95</sub> 43,9-100%) e um valor mínimo de 57,7% (IC<sub>95</sub> 39-74,5%) em agosto (Gráfico 3). O teste de probabilidade exata de Fisher revelou que a diferença entre

os meses é estatisticamente negligenciável, tendo consistentemente obtido valores de  $P > 0,05$ . É, no entanto, discutível a significância das prevalências obtidas em setembro e outubro, dado terem sido capturados três coelhos-bravos em cada um destes dois meses, e nenhum em novembro e dezembro (por oposição a 26 coelhos-ibéricos capturados em agosto) sendo assim o intervalo de confiança igualmente mais amplo (43,9-100% em setembro e outubro, 39-74,5% para o mês de agosto). No ano de 2019 foram igualmente escassas as amostras, tendo sido capturados apenas 3 coelhos entre janeiro e maio de 2019. Não serão, por isso, analisados estatisticamente os dados relativos a estes meses de forma longitudinal, mas sê-lo-ão no contexto global.

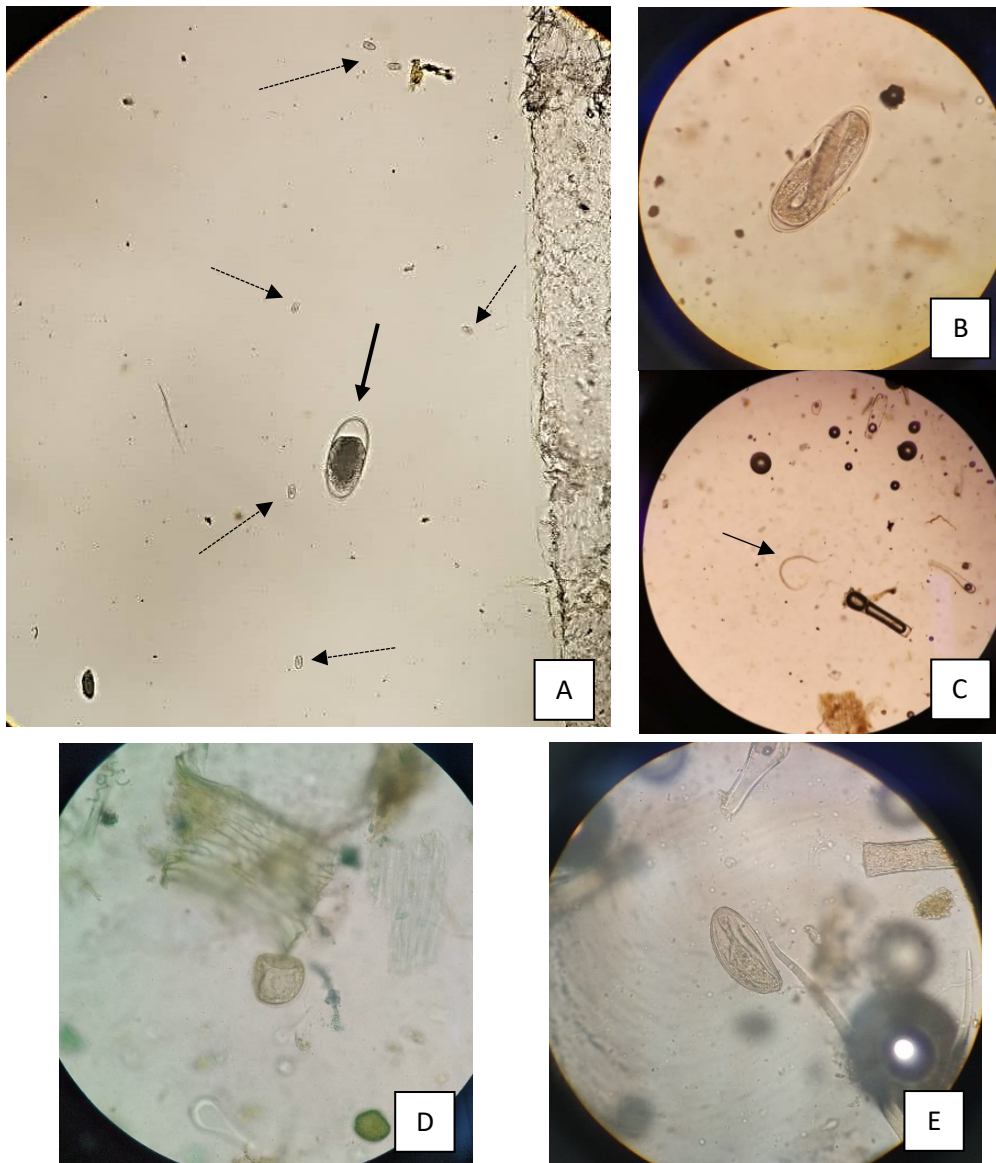
Os restantes resultados estão em concordância com a evolução esperada do parasitismo em climas mediterrânicos, nos quais a diversidade e quantidade de agentes de doença parasitária gastrointestinal são máximas nos meses mais húmidos, neste caso, maio (Silva et al. 2015).

**Gráfico 3- Evolução da Prevalência Global (%) e IC95 de parasitas gastrointestinais entre maio e outubro de 2018**



Nas análises coprológicas foram observados oocistos de coccídias (Figura 12 - A), atribuídos aos parasitas do género *Eimeria*, por ser este o único género destes protozoários conhecidos no coelho-europeu (Duszynski & Couch 2013). Na Península Ibérica, são conhecidas até à data as já referidas *E. irresidua*, *E. flavescens*, *E. media*, *E. magna*, *E. perforans* e *E. coecicola* (Silva et al. 2015), não tendo sido realizada neste estudo a distinção entre estas espécies. Foram também detetados ovos de nematodes oxíurídeos (Figura 12 – E), presumivelmente pertencentes à espécie *Passalurus ambiguus*, dado ser este o principal agente de oxíurose no coelho-europeu, podendo, no entanto, pertencer ao menos prevalente *Dermatophis hispaniensis*. Os ovos (e por vezes as respetivas larvas) de estrongilídeos gastrointestinais detetados (Figura 12 - A, B e C) pertencerão provavelmente às espécies *Nematodiroides zembrae*, *Trichostrongylus retortaeformis* e *Graphidium strigosum*, por serem as mais prevalentes deste grupo, não tendo sido feita a distinção entre as três. Os ovos de

cestodes anoplocefalídeos observados (Figura 12 – D) são resultantes possivelmente de infecção por *Cittotaenia ctenoides* (também designado por *Mosgovoyia ctenoides*) ou a menos prevalente *Cittotaenia denticulata*. Foi por último detetado um único caso de *Trichuris leporis*, considerado raro na literatura (Eira et al. 2007, Blasco et al. 1996).



**Figura 12- Ovos e larvas de parasitas ao microscópio ótico, detetados em análise coprológica (originais).**

A- Ovo de estrombilídeo (seta preta) e oocistos de coccídias (setas descontinuas). Ampliação 400x em câmara de McMaster. B - Ovo de estrombilídeo gastrointestinal contendo estágio larvar. Amplificação de 400x. C - Estádio larvar eclodido, de estrombilídeo (seta preta). Ampliação 100x. D- Ovo de anoplocefalídeo. Amplificação de 400x. E- Ovo de oxiurídeo. Amplificação de 400x.

Os grupos com maior prevalência foram as Coccídias por *Eimeria* sp. (47,5 %, IC<sub>95</sub> 38,1-57,2%), cestodes *u* (32,7%, IC<sub>95</sub> 24,3-42,3%) e nematodes Strongylidae ou estrombilídeos gastrointestinais (31,0%, IC<sub>95</sub> 22,8-40,6%) (Tabela 3). Este resultado era expectável num clima mediterrânico, como descrito por Blasco et al. (1996) para esta subespécie de coelho, tendo Eira et al. (2007) inclusive atribuído até 99,7% de todos os

helmintes na sua população a estrongilídeos gastrointestinais e ao cestode *Mosgovoyia ctenoides*. Ainda assim, o mesmo estudo obteve prevalências consideravelmente mais elevadas para estrongilídeos (para cada espécie de estrongilídeo, superiores a 50%) e para oxiurídeos (71% para *Passalurus ambiguus*), podendo os resultados do presente estudo ser explicados pela reduzida pluviosidade nos meses de amostragem.

A intensidade de excreção média foi de 7.256 oocistos por grama (máximo 107.250 OoPG), 427 ovos por grama (máximo 2.650 OPG) e 160 ovos por grama (máximo 900 OPG), para *Eimeria* sp., cestodes Anoplocephalidae e nematodes Strongylidae, respetivamente (Tabela 3). As excreções fecais de oocistos e ovos foram em média mais altas no grupo das coccídias (7256 ± 6243,2 OoPG) e mínimas no grupo dos oxiurídeos (94 ± 41,5 OPG) e para o parasita *Trichuris leporis* (50 OPG, embora este tenha sido um caso isolado no mês de maio). Estes valores estão de acordo com o descrito para estrongilídeos em Hobbs et al. (1999) e em Molina et al. (1999), estando consideravelmente mais elevados do que estudos anteriores para os anoplocefalídeos (Hobbs et al. 1999; Eira et al. 2007) e para as coccídias (Silva et al. 2015). Quanto aos oxiurídeos, é discutível a diferença observada, dado que as duas espécies deste grupo taxonómico anteriormente observadas em Portugal, *Passalurus ambiguus* e *Dermatoxys hispaniensis*, apresentam intensidades de excreção extremamente diferentes – a primeira cerca de 1500-2000 OPG, e a segunda cerca de 15-40 OPG (Molina et al. 1999; Eira et al. 2007). Assim, e dado que não foi realizada a distinção entre as duas no presente estudo, é possível que a intensidade de excreção observada para este grupo se deva a infeções de ambos estes parasitas.

**Tabela 3- Prevalência relativa e total e intervalo de confiança de 95% e intensidade de parasitismo e desvio-padrão obtidos na análise de 101 amostras colhidas entre maio de 2018 e maio de 2019.**

<b>Grupo taxonómico</b>	<b>Parasita</b>	<b>Prevalência (%) (IC<sub>95</sub>)</b>	<b>Intensidade (OPG/OoPG) ± DP</b>
Nematodes	Strongylidae ou estrongilídeos gastrointestinais	31,0 (22,8 – 40,6)	160 ± 218,9
	Oxyuridae	24,8 (17,4 – 34,0)	95 ± 63,5
	<i>Trichuris</i> sp.	1,0 (0,2 – 5,4)	50 (único)
Cestodes	Anoplocephalidae	32,7 (24,3 – 42,3)	427 ± 634,0
Protozoários	<i>Eimeria</i> spp.	47,5 (38,1 – 57,2)	7256 ± 1909,6
Total		70,3 (60,8 – 78,3)	3387 ± 13226,5

Entre janeiro e maio de 2019, foram capturados no total 3 coelhos-bravos, um em janeiro, um em março, e o último em maio. Estes três animais foram positivos nas análises

coprológicas para presença de parasitas gastrointestinais. Nas fezes do primeiro e segundo animais foram encontrados estrongilídeos gastrointestinais e coccídias, tendo o primeiro apresentado uma excreção de 50 OPG de estrongilídeos gastrointestinais. O terceiro coelho-bravo apresentou oocistos de *Eimeria* sp. nas fezes, numa excreção de 250 OoPG. Por ter diminuído desta forma drástica o número de capturas após agosto de 2018, e em particular por terem sido capturados apenas os referidos 3 coelhos-bravos entre novembro de 2018 e maio de 2019, não foi possível estabelecer uma relação fidedigna entre os parâmetros estudados e a mortalidade da população no período proposto. À data não foi averiguada ao certo a razão para este declínio, no entanto foram testadas as seguintes hipóteses:

O intervalo entre campanhas poderia ser demasiado curto para permitir que a população ganhasse novamente ingenuidade (*naïveté*) para não ver ameaça nas armadilhas, portanto aumentou-se o intervalo em duas semanas, no entanto o número de capturas manteve-se;

A abundância de alimento fresco no inverno podia ter tornado a cenoura fresca um isco menos apetecível, pelo que foram testados outros iscos, como figo seco, manteiga de amendoim e urina de coelho-europeu, não tendo sido observada preferência por estes iscos e abandonada a hipótese.

A população poderá ter sofrido um declínio na sua abundância, pelas já referidas doenças infetocontagiosas, sendo, no entanto, impossível de o comprovar de forma fidedigna.

Coloca-se então novamente a hipótese de a população ter aprendido a perceber uma ameaça nas armadilhas, propondo-se aumentar o intervalo entre campanhas para dois meses e diminuir a duração de cada campanha para duas noites de armadilhagem.

No decorrer do estudo, as prevalências dos vários grupos de parasitas sofreram flutuações, tendo o grupo das coccídias e o grupo dos estrongilídeos atingido um mínimo no mês de agosto (15,4% IC<sub>95</sub> 6,2-33,5%, para ambos) e o grupo dos anoplocefalídeos e o dos oxiurídeos atingido a máxima prevalência nesse mesmo mês (42,3 IC<sub>95</sub> 25,6 - 61,1 e 34,6% IC<sub>95</sub> 19,4 – 53,8%, respetivamente) (Gráfico 4). A variação nestas proporções revelou-se não significativa (teste de Fisher  $p > 0,05$  para todos os meses, todos os grupos taxonómicos).

Sabe-se que tanto as coccídias como os estrongilídeos gastrointestinais atingem maiores prevalências em climas húmidos, no caso das coccídias por apenas ser possível terminar o ciclo de vida nas espécies cuja esporulação seja rápida (Silva et al. 2015), e no caso dos estrongilídeos gastrointestinais por entrarem em hipobiose quando se encontram sob stress ambiental (Anderson 2000). Era então expectável que em agosto, o mês mais seco do ano nesta região, sofressem este declínio em prevalência. Assim, é possível que caso a amostra tivesse sido maior, se observariam diferenças significativas.

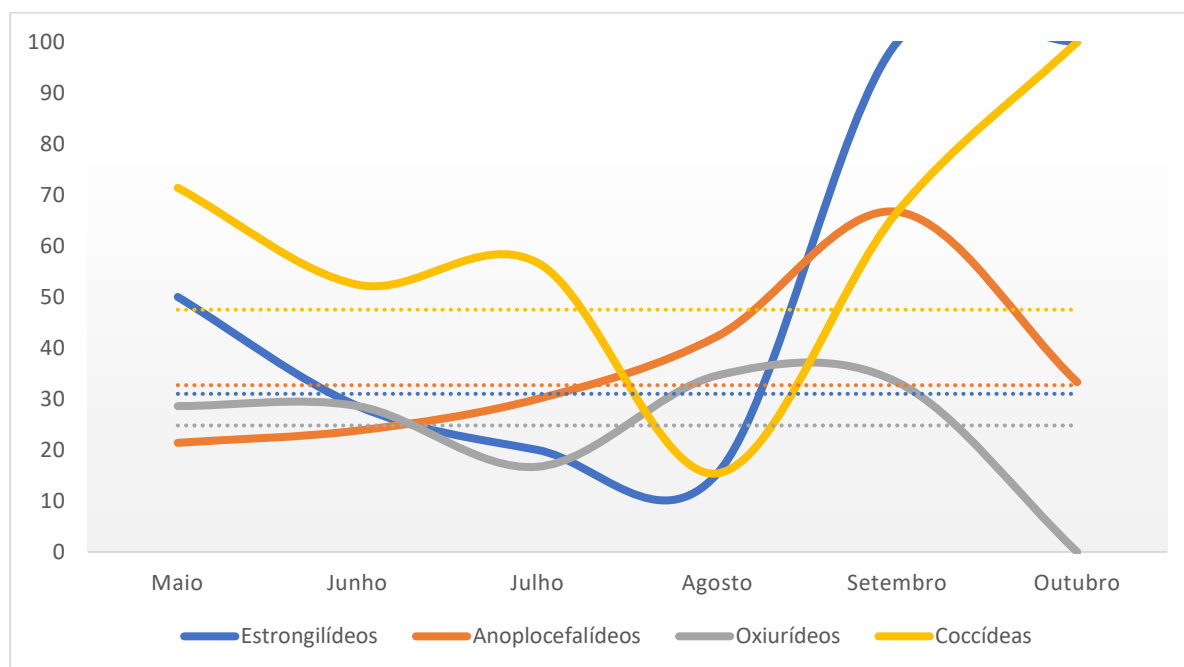
O pico na prevalência de oxiurídeos observado no mês de agosto, apesar de ser provavelmente devido ao acaso (segundo o teste de probabilidade exata de Fisher, esta probabilidade foi  $> 0,1$  para as diferenças observadas entre cada par de meses), pode ser

explicado por o período pré-patente de 2 meses característico do parasita mais prevalente deste grupo, *Passalurus ambiguus*, coincidir com o mês de junho, no qual ocorreu, no ano de 2018, um aumento da precipitação nesta região (Gráfico 5- C). A mesma explicação surge para a diminuição ligeira observada de junho para julho, ao observar o pico de precipitação no mês de abril de 2018, e a súbita diminuição em maio (Gráfico 5- A e B).

Uma possível explicação será que a sobrevivência destes parasitas é favorecida por aumentos na humidade, no entanto não é significativamente afetada pela diminuição da mesma, dada a resistência dos ovos à dessecação. Adicionalmente, o método de transmissão destes parasitas favorece uma prevalência estável ao longo do ano, sendo que depositam ovos no reto do hospedeiro, expelidos depois nas fezes onde completam o seu desenvolvimento até à fase infetante, sendo estas fezes ingeridas pelo mesmo indivíduo, o qual se mantém infetado (Anderson 2000).

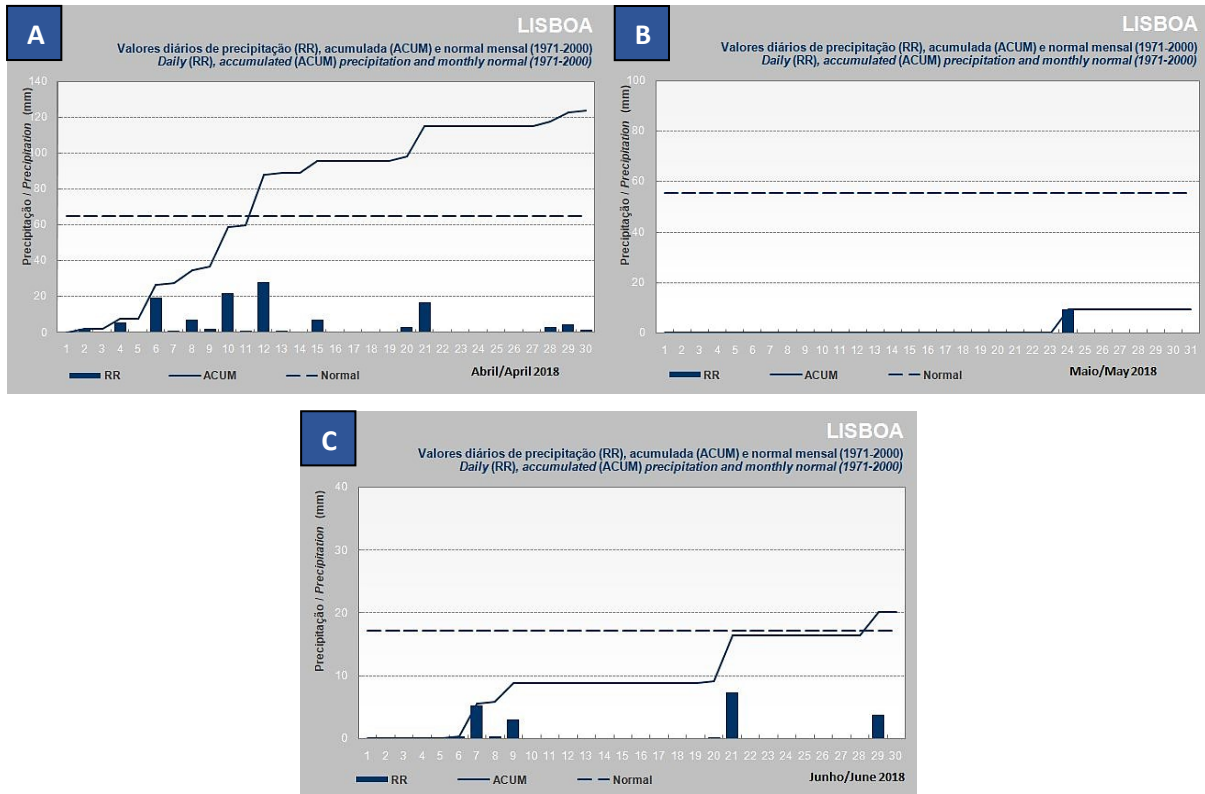
Quanto à prevalência dos anoplocefalídeos, esta está associada à presença de hospedeiros intermediários na vegetação, neste caso, os ácaros oribatídeos, que são ingeridos aquando do consumo de erva fresca (Bowman et al. 2014). Assim, seria expectável a diminuição da prevalência desta infeção com a diminuição de disponibilidade de alimento fresco e de condições para a sobrevivência destes insetos, como seria o caso nos meses mais secos do ano, o que, no entanto, não parece ter sido ainda observado, na bibliografia consultada (Hobbs et al. 1999, Molina et al. 1999, Bowman et al. 2014)

**Gráfico 4- Variação da prevalência parasitária gastrointestinal para cada grupo, entre maio e outubro de 2018.**



As linhas a cheio representam a prevalência de cada grupo, correspondendo as linhas descontínuas à prevalência média para os mesmos grupos obtida para todo o período de estudo. É observável uma evolução díspar das prevalências dos diferentes grupos parasitários em setembro e outubro.

**Gráfico 5 – Valores de precipitação diária (colunas), acumulada (traço contínuo) e normal mensal (traço descontinuo), em abril (A), maio (B) e junho (C) de 2018 (IPMA c2019).**



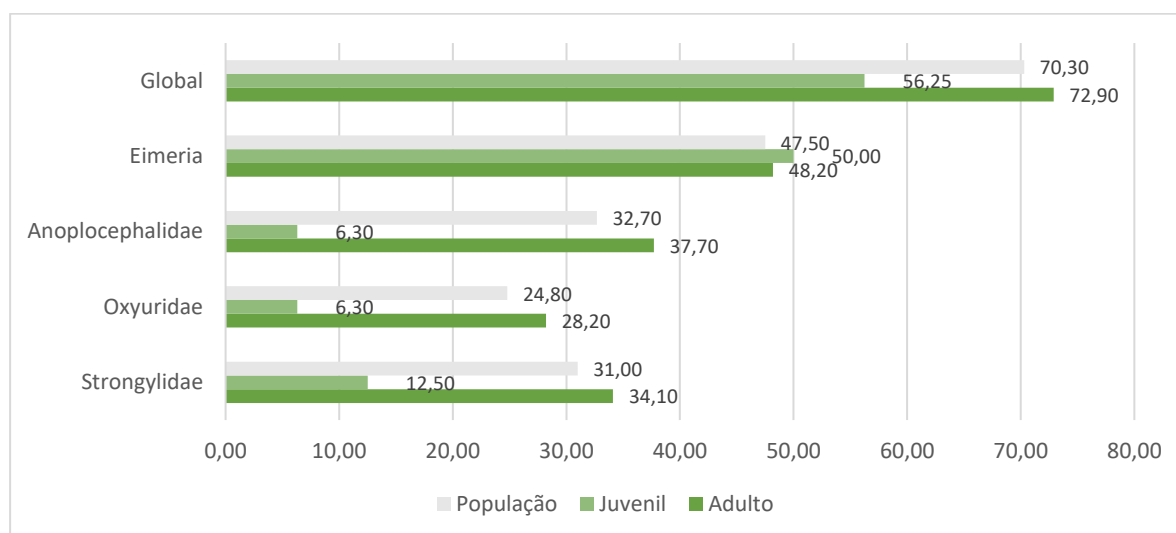
Foram detetadas prevalências globais mais elevadas em fêmeas e em adultos (75,8%, IC<sub>95</sub> 65,9-84,8% em fêmeas *versus* 61,5%, IC<sub>95</sub> 45,9-75,1% em machos e 72,9%, IC<sub>95</sub> 62,7-81,2% em adultos *versus* 56,3%, IC<sub>95</sub> 33,2-76,9 em juvenis) tendo o teste de chi-quadrado com correção de Yates para a diferença entre sexos e o teste de probabilidade exata de Fisher para a diferença entre classes etárias revelado que esta relação não é significativa (p=0,19 e p=0,18, respetivamente) (Gráficos 6 e 7).

A prevalência foi ligeiramente mais elevada em juvenis apenas nas coccídias (50%, IC<sub>95</sub> 28-72% para juvenis, 48,2%, IC<sub>95</sub> 37,9-58,7% para adultos) (Gráfico 6), tendo, no entanto, o teste de chi-quadrado revelado uma muito provável independência entre a classe etária e a prevalência de coccídias (com correção de Yates p=0,89). Era esperada uma variação significativa para este parasita, tendo estudos anteriores referido prevalências mais elevadas em juvenis e recém-nascidos até aos 4 meses de idade (Hobbs et al. 1999, Duszynski and Couch 2013), sendo a não significância neste estudo devida provavelmente à reduzida amostragem de juvenis.

A prevalência mais elevada de helmintes gastrointestinais em adultos foi já antes documentada, com diferenças particularmente notáveis nos parasitas anoplocefalídeos e oxiurídeos (Molina et al. 1999), tal como foi verificado no presente estudo. O teste de chi-quadrado de Pearson revelou que esta diferença no presente estudo não é significativa em estrongilídeos gastrointestinais (p=0,29), podendo isto dever-se à reduzida amostragem

relativa de juvenis e à prevalência reduzida de strongilídeos na população geral. Quanto à prevalência de anoplocefalídeos e de oxiurídeos, a prevalência observada é significativamente mais elevada em adultos (teste de chi-quadrado de Pearson  $p=0,01$  e teste de probabilidade exata de Fisher  $p=0,03$ , respetivamente). Estes resultados podem ser comparados com o estudo de Molina et al. (1999), o único consultado que estudou a variação da prevalência entre classes etárias para várias espécies de helmintes gastrointestinais, o qual detetou concordantemente prevalências mais altas em adultos no grupo dos anoplocefalídeos, mas o contrário nos oxiurídeos. Segundo referem Hobbs et al. (1999), relativamente à intensidade de excreção de parasitas oxiurídeos, esta foi mais elevada em adultos, sendo que a infeção por coprofagia pode agravar a infeção ao longo da vida. Assim, uma amostra mais elevada poderia revelar uma tendência inversa ou confirmar a tendência aqui constatada.

**Gráfico 6- Prevalência (%) dos principais grupos parasitários em adultos e juvenis, comparada com a prevalência sem distinção de faixa etária (População) e sem distinção de grupo parasitário (Global).**



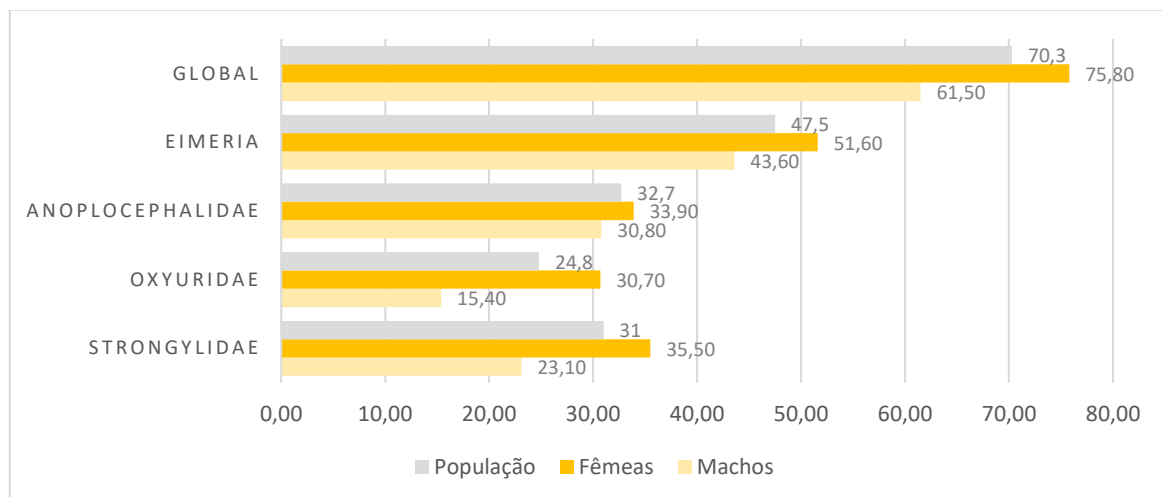
A prevalência global foi ligeiramente mais elevada em fêmeas, particularmente no grupo dos oxiurídeos (30,7%, IC<sub>95</sub> 20,6-43,0% *versus* 15,4%, IC<sub>95</sub> 7,2-29,7%) (Gráfico 7), sendo esta diferença significativa, já que o teste de probabilidade exata de Fisher revelou uma probabilidade  $p=0,04$ . Relativamente a este resultado, há estudos anteriores discordantes, que observaram prevalências independentes do sexo para parasitas oxiurídeos (Hobbs et al. 1999 e Eira et al. 2007), e um estudo concordante, que observou prevalências mais elevadas em fêmeas (Blasco et al. 1996).

Para cada grupo taxonómico, as diferenças observadas a nível da prevalência entre machos e fêmeas foram não significativas, (para anoplocefalídeos,  $p=0,92$ , coccídias  $p=0,55$ , Strongylidae  $p=0,27$ , em testes chi-quadrado), sendo isto esperado a nível das coccídeas, já

que estudos anteriores mencionam prevalências semelhantes entre sexos (Hobbs et al. 1999; Duszinski & Couch 2013).

Considerando os estudos feitos até à data, tem-se detetado maior suscetibilidade para anoplocefalídeos e para alguns strongilídeos gastrointestinais em fêmeas, no entanto prevalências geralmente menores para a maioria dos strongilídeos em fêmeas (Eira et al. 2007, Molina et al. 1999). Eira et al. (2007) também observaram prevalências globais ligeiramente menores em fêmeas para os vários helmintes gastrointestinais detetados, tendo esta discordância a ver com o resultado obtido neste estudo possivelmente devida ao facto de a amostra ter sido anual, contrariamente a mensal, já que é sabido que a prevalência das doenças parasitárias gastrointestinais sofre alterações consoante a estação e estado reprodutivo, estando, por exemplo, as hormonas reprodutivas das fêmeas associadas a uma maior suscetibilidade a parasitoses gastrointestinais (Hobbs et al. 1999, Molina et al. 1999). Anteriormente, Blasco et al. (1996) detetaram prevalências de helmintes gastrointestinais maiores em fêmeas comparativamente aos machos estudados, tendo este estudo incluído meses dentro e fora da época reprodutiva. Neste mesmo estudo, também é referido que esta diferença foi observada durante a época reprodutiva, enquanto que fora desta época é observado o contrário. Assim, a ocorrência de prevalências não significativamente variáveis entre sexos na população presentemente estudada poderá dever-se ao facto de o período de amostragem ter sido sobretudo no final da época reprodutiva.

**Gráfico 7- Prevalência (%) dos principais grupos parasitários em machos e fêmeas, comparada com a prevalência sem distinção de sexo (População) e sem distinção de grupo**



Foi impossível comparar com significância, dentro de cada grupo de helmintes, a intensidade de excreção entre animais adultos e animais juvenis, dada a escassez de dados

quantitativos principalmente para esta última faixa etária. Assim, para análise estatística, examinou-se apenas o seu conjunto.

Dada a clara influência dos dados relativos às coccídias nas médias globais de excreção, por serem excretadas quantidades elevadas de oocistos, procurou-se separá-los dos restantes, por forma a fazer uma comparação mais exata entre faixas etárias e sexos. Assim, foi possível observar uma maior intensidade de excreção de oocistos de coccídias em machos ( $12158,3 \pm DP 12227$  OoPG *versus*  $4393,5 \pm 3373$  em fêmeas), no entanto não significativa ( $p=0,84$  em teste de ANOVA), sendo esta igualmente mais elevada em coelhos juvenis ( $21641,7 \pm DP 33870$  OoPG), a qual, embora tenha sido cerca de 5 vezes superior à obtida para adultos ( $4037,9 \pm DP 3207,9$  OoPG), não foi estatisticamente significativa ( $p=0,79$  em teste de ANOVA).

Foi impossível a comparação de excreções de ovos de helmintes entre faixas etárias, dada a inexistência de dados quantitativos para juvenis para este grupo. Foi possível observar uma taxa de excreção de ovos de helmintes mais elevada em fêmeas ( $272,6 \pm DP 442,4$  comparativamente a  $195,5 \pm DP 166,5$  em machos) (Tabela 4), sendo esta diferença a esperada para a maioria dos parasitas helmintes gastrointestinais (Hobbs et al. 1999; Molina et al. 1999). Esta, no entanto, não foi estatisticamente significativa no estudo em causa (teste ANOVA  $p=0,39$ ). Isto poderá dever-se novamente à não distinção parasitária entre as espécies de estrombilídeos referidas individualmente na bibliografia citada, cuja excreção não é mais elevada em fêmeas para todas (Eira et al. 2007). Poderá ter acontecido nesta população uma prevalência mais elevada de espécies cuja prevalência não varia com o sexo, ou que é contrariamente mais elevada em machos, já que a prevalência de estrombilídeos foi também mais baixa do que o esperado.

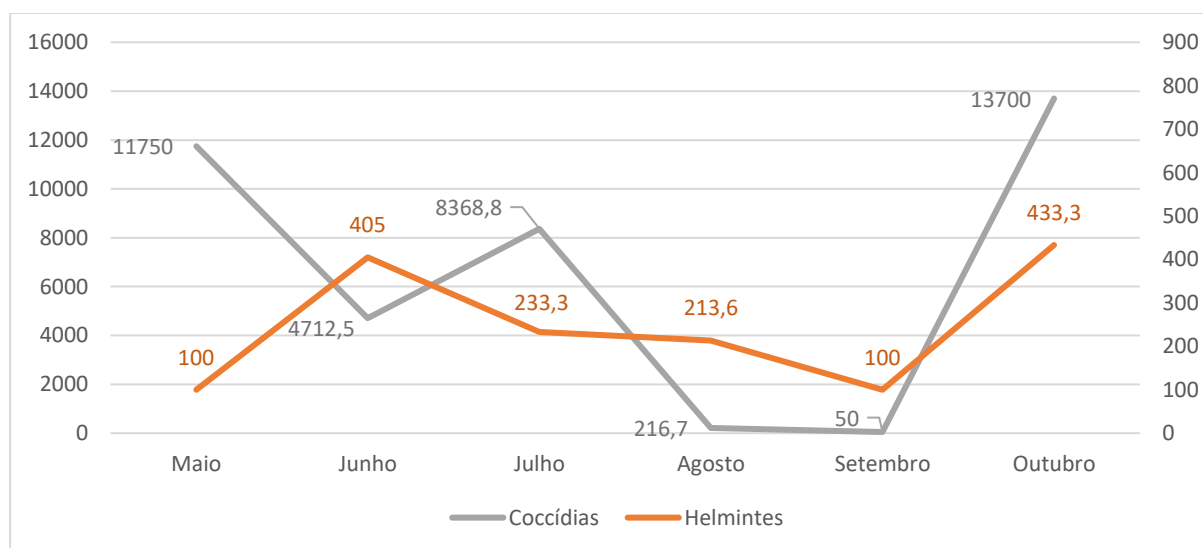
**Tabela 4- Intensidades de excreção  $\pm$  DP para o grupo das coccídias comparadas às dos restantes grupos combinados, entre sexos, faixas etárias e a população geral.**

	<b>Amostra total</b>	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juvenis</b>
<b>Coccídias (OoPG <math>\pm</math> DP)</b>	$7256 \pm 45851,96$	$12158,3 \pm 12227$	$4393,5 \pm 3373$	$4037,9 \pm 3207,9$	$21641,7 \pm 33870$
<b>Helmintes (OPG <math>\pm</math> DP)</b>	$252,4 \pm 442,4$	$195,5 \pm 166,5$	$272,6 \pm 506,6$	$252,4 \pm 442,4$	Sem dados quantitativos

Utilizando esta mesma separação de dados, foi esquematizada em gráfico a evolução da intensidade de excreção entre maio de 2018 e outubro de 2018, discriminando a intensidade de excreção de oocistos de *Eimeria sp.* e de ovos de helmintes nas fezes (Gráfico 8). É fácil observar que a diminuição da excreção se deu para ambos os grupos nos meses mais secos, sendo esta mais drástica para as coccídias, o que está de acordo com estudos anteriores, como o de Silva et al. (2015). Esta é explicada pela sensibilidade mais elevada das formas livres das espécies de coccídias à dessecação por diminuição de humidade

estival, relativamente à resistência das formas ambientais da maioria dos helmintos (Bowman et al. 2014). O teste de ANOVA revelou que a evolução temporal da excreção oocistos de coccídias e de ovos de helmintos não foram estatisticamente significativas ( $p=0,09$  e  $p=0,62$ ), possivelmente devido à disparidade entre meses no número de amostras sujeitas a análise em McMaster.

**Gráfico 8 – Progressão temporal da excreção de oocistos de coccídias (escala à esquerda) e ovos de helmintos (escala à direita), entre maio e outubro de 2018.**



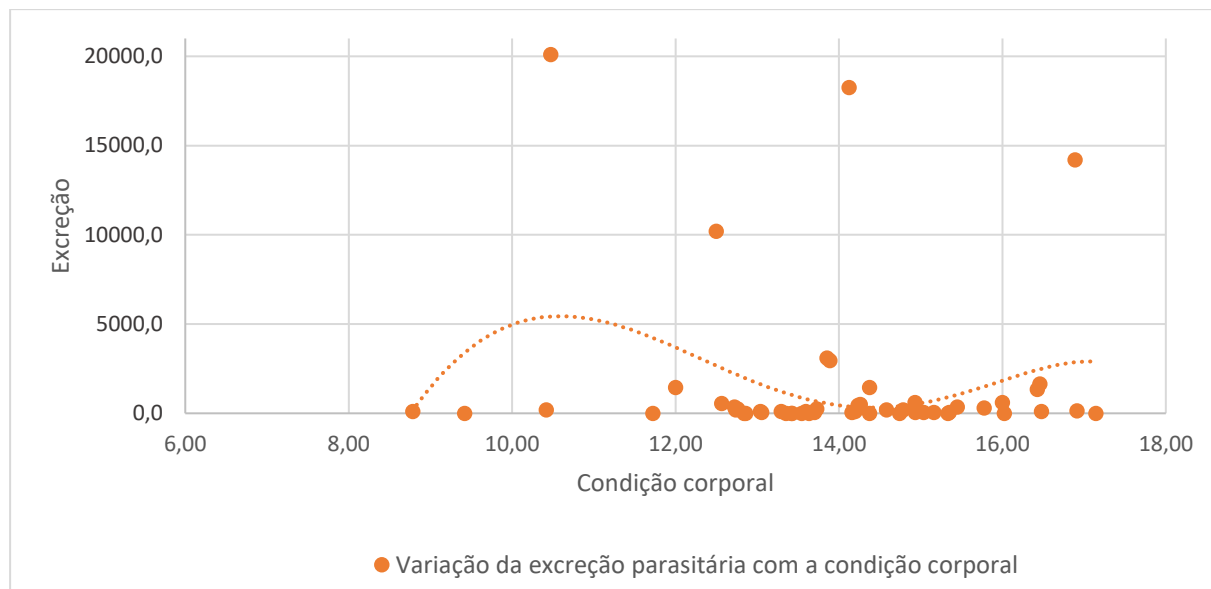
Relativamente à análise da condição corporal comparada com a excreção parasitária (Gráfico 9), pode observar-se um pico na linha de tendência perto da condição corporal 10. Segundo Sweet et al. (2013), valores inferiores a 16 indicam condição corporal inferior a 2,5 numa escala de 1-5, e entre 16 e 23 indicam condição corporal entre 2,5 e 3,5 na mesma escala. É assim possível desde já referir que a população total amostrada está abaixo da condição ideal ( $13,3 \pm DP 2,2$ ), o que poderá indicar condições adversas à sua sobrevivência neste habitat.

Ao observar estes dados em paralelo com os relativos à excreção de oocistos e ovos nas fezes, os valores mais altos parecem estar associados aos extremos inferiores e superiores de condição corporal observada na população, parecendo minimizar-se entre as condições corporais 14 e 15, tornando a subir após esse valor, para o qual o número de casos é também menor.

Estudos anteriores não procuraram estabelecer esta relação no coelho selvagem, e o único que o fez (Eira et al. 2007) utilizou cadáveres, calculando a condição corporal através do índice de gordura renal. Nesse estudo observou-se uma redução na condição corporal apenas em coelhos infetados com o anoplocefalídeo *Mosgovoyia ctenoides*, não sendo este o caso observado no presente estudo, no qual os animais positivos para anoplocefalídeos (os quais, apesar de não ter sido identificada a espécie, se sabe serem atribuíveis

maioritariamente a *M. ctenoides*) tinham uma condição corporal entre 10,42 e 16,91 (em média  $14,33 \pm DP 1,5$ ), a qual é superior à média da população.

**Gráfico 9 - Dispersão de pontos relacionando a condição corporal (peso em Kg / comprimento do tarso em metros) com a taxa de excreção parasitária nas fezes.**



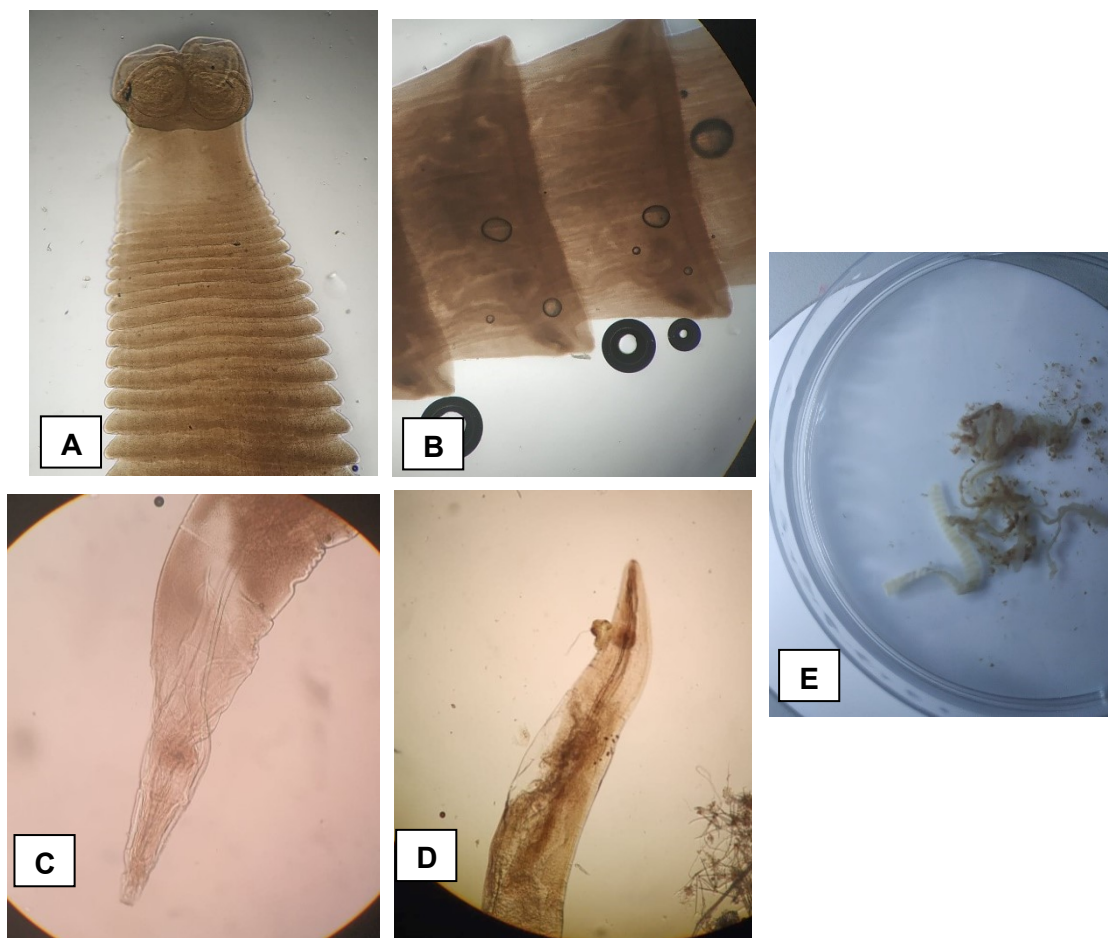
Foram organizados em *cluster* os dados para a excreção, em função da condição corporal, para cada indivíduo, para os quais se desenhou uma linha de tendência, procurando observar a relação da condição corporal com a intensidade de excreção de oocistos e ovos nas fezes.

### **Análise post-mortem do trato gastrointestinal de três cadáveres**

Os relatórios de necrópsia dos três cadáveres encontrados durante o estudo (anexo 3) revelaram que apenas o terceiro foi positivo para o VDHV2 (número de captura 118). Este tinha sido encontrado na berma de um estradão, detetando-se rigidez cadavérica avançada e epistáxis numa primeira observação. A necrópsia permitiu revelar congestão das mucosas oculares e respiratórias e conteúdo hemorrágico nas vias respiratórias, incluindo congestão pulmonar. O pós-boca continha alimento fresco, bem como o estômago, notando-se uma ligeira esplenomegália. O quadro lesional de traqueíte hemorrágica direcionou o diagnóstico para DHV, confirmando-se como agente etiológico o VDHV2 por teste virológico por RT-PCR. Este diagnóstico etiológico, conjugado com os sinais de morte súbita (alimento no trato gastrointestinal superior) e a escassez de outros sinais prevalentes, são compatíveis com doença hiperaguda, a qual representa um quadro patogénico mais frequente desta estirpe do vírus (Neimanis et al. 2018).

A análise do trato gastrointestinal destes mesmos cadáveres permitiu observar parasitas adultos nos três. De entre os dois coelhos-bravos cuja causa de morte foi aferida como predação na armadilha, um apresentava um espécime adulto do género *Andrya* no intestino delgado e um escólex com vários proglótides de *Cittotaenia* sp. no intestino grosso; enquanto o outro apresentava uma maior quantidade de parasitas gastrointestinais: foram

encontrados 22 adultos da espécie *Passalurus ambiguus* e um adulto de *Cittotaenia* sp. no intestino grosso, bem como um segundo adulto de *Cittotaenia* sp. no intestino delgado, tendo sido detetados vários proglótides e dois escólices (Figura 13). No animal positivo para VDHV2, foi possível contabilizar 23 espécimes de *Passalurus ambiguus* em fase adulta no intestino delgado, um no intestino grosso, e um parasita que se presumiu ser *Dermatoxys* sp. (possivelmente *D. hispaniensis*), embora a observação fosse dificultada pelo estado de deterioração do parasita (Figura 13, imagem C), no intestino grosso. Este último foi o único parasita do seu género detetado em toda a população, estando isto em discordância com a prevalência intermédia (entre 4,6 e 40%) mencionada por Eira (2007) para este parasita, estando, no entanto, a intensidade de parasitismo (um parasita) enquadrada naquela já documentada no mesmo estudo.

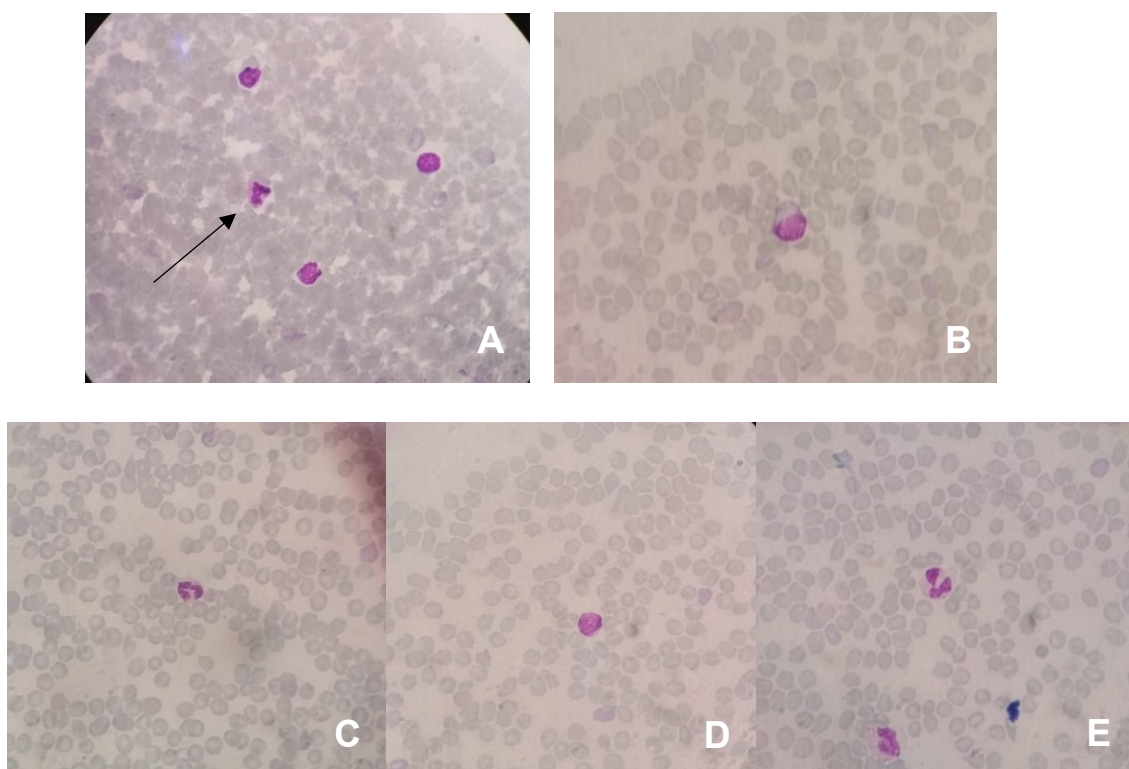


**Figura 13 – Helmintos parasitas gastrointestinais observados nos tratos gastrointestinais dos cadáveres analisados *post-mortem* (originais)**

Imagem A- Escólex e proglótides de *Cittotaenia* sp., observados ao microscópio ótico em ampliação de 50x., sem coloração. B- Pormenor de proglótides de outro espécimen de *Cittotaenia* sp., sendo possível observar poros genitais bilaterais em segmentos maduros. Observado ao microscópio ótico em ampliação 50x, sem coloração. C- Extremidade anterior de *Dermatoxys* sp., de observação difícil, notando-se o procorpo junto ao orifício bucal e o bulbo posterior. Ampliação de 50x ao microscópio ótico, sem coloração. D- Extremidade anterior de *Passalurus ambiguus*, notando-se a característica forma redonda do bulbo mediano e o procorpo dimensionado, anterior a este. Ampliação de 50x ao microscópio ótico, sem coloração. E- Céstode, em placa de petri.

## **Hematologia**

Relativamente aos parâmetros hematológicos (Tabela 5), uma primeira observação é a de que os valores obtidos para a contagem diferencial de eosinófilos se encontram, para todas as populações e ao longo de todo o estudo, acima do valor de referência de Hein e Hartman (2003). Como previamente descrito, os eosinófilos e os neutrófilos nesta espécie são muito semelhantes e dificilmente se distinguem se não for possível observá-los simultaneamente e comparar as suas dimensões (Marshall 2008), podendo ter ocorrido erro nesta contagem. No entanto, os restantes valores encontram-se conforme os referenciados. A figura 14 exhibe exemplos de células observadas em esfregaço corado com Giemsa.



**Figura 14- Esfregaços de sangue corado por Giemsa, em amplificação 400x (originais)**

Imagem **A**: A seta a preto aponta um basófilo desgranulado. As restantes células nucleadas correspondem a linfócitos. **B**: Linfócito. **C**: Neutrófilo. **D**: Linfócito. **E**: Neutrófilos, corados de púrpura; artefacto, corado de azul.

O hematócrito obtido para adultos ( $36,04 \pm DP 9,39\%$ ) e para machos ( $36,02 \pm DP 8,99\%$ ) foi mais elevado do que aquele dos juvenis ( $31,56 \pm DP 4,41\%$ ) e fêmeas ( $35,11 \pm DP 2,99\%$ ), respetivamente. Esta relação verificou-se igualmente para a contagem absoluta de eritrócitos, de leucócitos, e relativa de eosinófilos, sendo todas estas relações, no entanto, não significativas segundo o teste de ANOVA ( $p > 0,05$  para todos os parâmetros na comparação entre sexos e classes etárias). A contagem relativa de neutrófilos foi sensivelmente igual entre os sexos ( $37,17 \pm 17,1$  em fêmeas,  $37,00 \pm 16,80$  em machos), e ligeiramente mais elevada em juvenis ( $40,00 \pm 15,5$ ,  $36,68 \pm 16,9$  em adultos, variação não

significativa segundo o teste de ANOVA,  $p=0,48$ ). As porções leucocitárias de linfócitos e monócitos foram mais elevadas em fêmeas (variações estatisticamente não significativas, segundo o teste de ANOVA,  $p=0,26$  e  $p=0,17$  respetivamente), tal como a hemoglobina (igualmente não significativo, já que o teste de ANOVA obteve  $p=0,74$ ).

Leineweber et al. (2018) estudaram a influência do sexo e gestação nos parâmetros hematológicos do coelho, tendo observado nos machos valores mais elevados de concentração de hemoglobina e de contagem de eritrócitos, e nas fêmeas gestantes um aumento da contagem absoluta de leucócitos por linfocitose durante a primeira metade da gestação, surgindo alguma linfopenia e leucopenia relativa na segunda metade. Estas variações na população presentemente estudada, em particular a linfocitose em fêmeas e a não observação das diferenças esperadas em machos, podem dever-se a uma elevada proporção de fêmeas, bem como de gestantes na população feminina, algo que não foi testado nos indivíduos.

**Tabela 5 - Valor médio e desvio-padrão dos vários parâmetros hematológicos quantificados no total da população analisada (Geral), e calculado separadamente para Juvenis, Adultos, Fêmeas e Machos, em paralelo com os valores de referência (Hein & Hartman 2003; Leineweber 2018) do coelho europeu doméstico.**

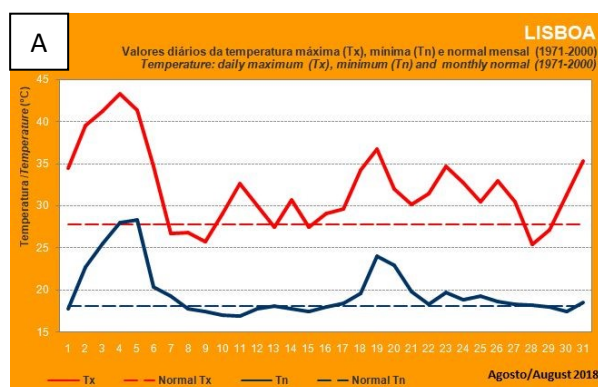
	Juvenis	Adultos	Fêmeas	Machos	Geral	Valor ref.
<b>Hematócrito (%)</b>	31,56 ±5,22	36,04 ±9,39	35,11 ±9,25	36,02 ±8,99	35,45 ±9,04	28-48
<b>Eritrócitos (<math>\times 10^9</math>)</b>	4,96±1,22	5,35±1,58	5,11 ±1,64	5,62 ±1,76	5,3 ±1,67	4,37-7,43
<b>Leucócitos (<math>\times 10^9</math>)</b>	4,69 ±2,48	6,11 ±3,38	5,80 ±2,80	6,05 ±4,10	5,90 ±3,22	2,71-12,23
<b>Neutrófilos (%)</b>	40,00 ±15,5	36,68 ±16,9	37,17±17,1	37,00 ±16,8	37,11±16,8	15-60
<b>Basófilos (%)</b>	2,3 ± 2,9	2,0 ±2,7	1,8 ±2,6	2,50 ±2,85	2,0 ±3,00	<5(ad.) <8(juv.)
<b>Eosinófilos (%)</b>	6,5 ±7,3	8,8 ±9,5	7,1±8,4	10,8 ±10,3	8,5±9,2	<1
<b>Linfócitos (%)</b>	47,5 ±4,3	46,6 ±2,1,2	47,62 ±21,19	45,22 ±18,81	47,00 ±21,00	32-81
<b>Monócitos (%)</b>	4,8 ±2,8	5,8 ±3,8	6,3 ±3,9	4,6 ±3,1	5,7 ±3,6	<12
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	93,5±14,6	98,9±27,2	99,2 ±26,0	96,7 ±28,5	98,3 ±26,8	89,63 - 152, 82

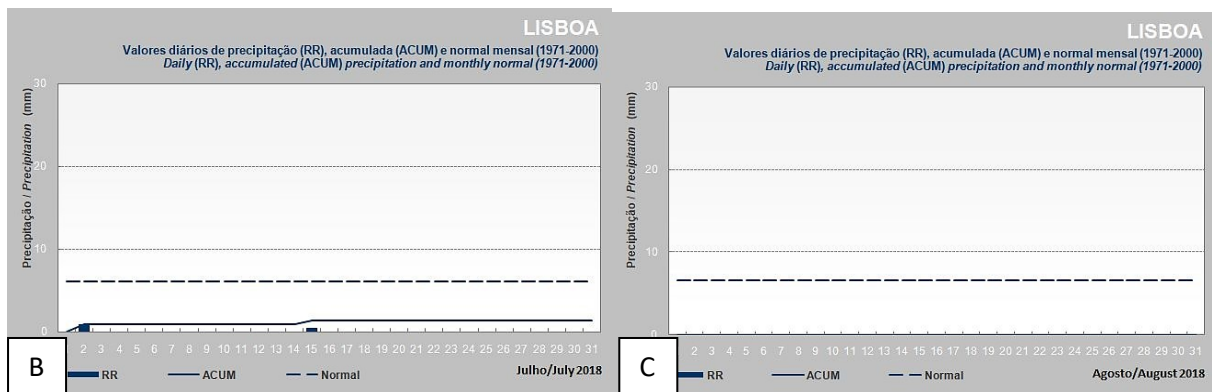
Os vários parâmetros hematológicos foram também avaliados quanto à sua evolução temporal, entre maio e agosto de 2018, observando-se em junho uma diminuição na contagem de neutrófilos e aumento de todas as outras células leucocitárias, tendo a contagem absoluta de leucócitos também diminuído (Gráficos 11 a 13).

Os testes de ANOVA revelaram que a variabilidade do hematócrito, das contagens de leucócitos e diferenciais para todos os tipos de células leucocitárias, entre meses não é significativa, mesmo quando se incluíram os valores para outubro, ( $p > 0,01$  em todos), mas que as alterações observadas na contagem de eritrócitos são significativas ( $p < 0,05$ ) tendo o teste de Tukey detetado que apenas as diferenças entre os meses de junho e julho e entre junho e agosto são significativas, respetivamente, com valores de  $p < 0,05$  e  $< 0,01$ .

O mês de junho de 2018 foi, em termos climáticos, o expectável para a região. Contrariamente, os meses de julho e agosto do mesmo ano foram extremamente secos, tendo em particular agosto sido adicionalmente quente, atingindo temperaturas médias diárias mais elevadas do que o normal (Gráfico 10). Assim, poderá colocar-se a hipótese de que estas alterações climáticas tenham influenciado o valor de eritrócitos, neste caso aumentando-o. Não é conhecida à data esta relação nas publicações consultadas. Esta poderá ter sido causada por desidratação com tempo quente, que poderá igualmente ter feito aumentar o hematócrito, embora de forma insuficiente para surgir como estatisticamente significativa (Melillo 2007).

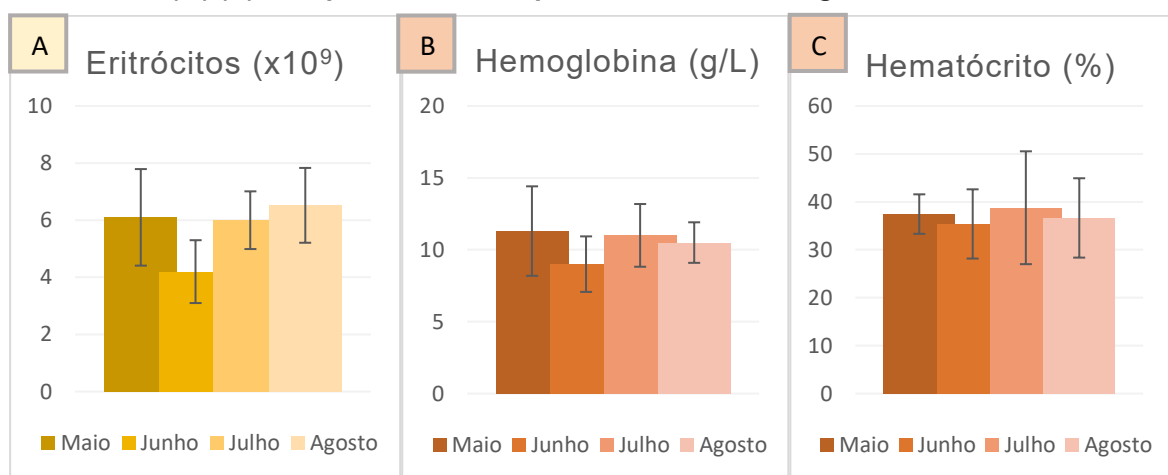
**Gráfico 10 – A – Valores diários da temperatura máxima (vermelho), mínima (azul) e normal mensal (linhas descontínuas horizontais) em agosto. B e C (página seguinte) - Valores de precipitação diária (colunas) acumulada (traço contínuo) e normal mensal (traço descontínuo) na região de Lisboa, em julho e agosto, respetivamente (IPMA c2019).**





Ao avaliar a evolução temporal da contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito paralelamente (Gráfico 11), observa-se uma tendência semelhante para os três, previsivelmente. Pela relação próxima entre a concentração de hemoglobina e a contagem eritrocitária, será de esperar, numa amostra de maiores dimensões, uma variação igualmente significativa estatisticamente para a primeira.

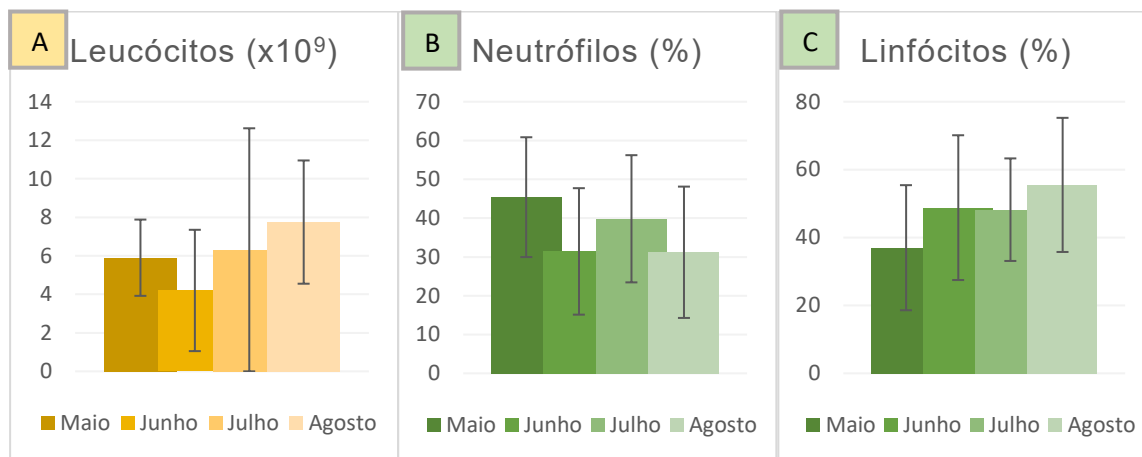
**Gráfico 11 - Contagem de eritrócitos ( $\times 10^9$ ) (A), concentração de hemoglobina (g/L) (B) e hematócrito (%) (C) e respetivos desvios-padrão, entre maio e agosto de 2018.**



Ao observar as tendências temporais para os principais componentes leucocitários (neutrófilos e linfócitos), em paralelo com a contagem de leucócitos (Gráfico 12), estas são sugestivas de uma leucocitose ligeira, simultânea com uma diminuição do rácio neutrófilos/linfócitos gradual. Em maio este padrão é mais facilmente observável, e constitui o padrão leucocitário mais comum em caso de inflamação, no qual apenas raramente ocorre leucocitose (Melillo 2007), sendo este igualmente o mês com prevalência mais elevada no

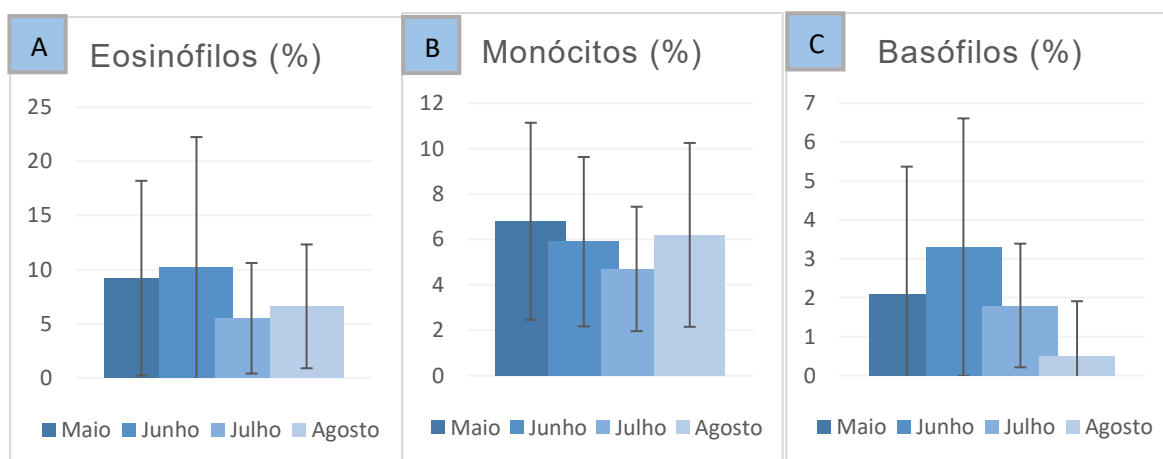
período de estudo ( $92,9 \pm IC_{95} 68,5-98,7$ ). A associação da presença de infecção parasitária com estas contagens seria previsível, e será tentada a sua análise infra.

**Gráfico 12 – Variação da contagem absoluta de leucócitos ( $\times 10^9$ ) (A) e contagens diferenciais de neutrófilos (B) e linfócitos (C) (%) e respetivos desvios-padrão, entre maio e agosto de 2018.**



A variação temporal da contagem de eosinófilos (Gráfico 13 – A) deverá desde já ser descartada, dada a discrepância elevada com os valores de referência provavelmente devida a erros de contagem, já que a eosinofilia é rara em coelhos (Melillo 2007). As variações entre estes meses nas contagens diferenciais de monócitos e basófilos (Gráfico 13 – B e C) não foram significativas em ANOVA, sendo de notar que não foi observada monocitose ( $>12\%$ , segundo Hein & Hartman 2003), nem basofilia ( $>5\%$  em adultos,  $>8\%$  em juvenis, segundo Hein & Hartman 2003). A monocitose está associada a inflamação crónica, no entanto a sua ausência não exclui a possibilidade de presença de inflamação, estando a basofilia associada, quando conjugada com eosinofilia, a patologias crónicas de pele como atopia ou pioderma (Melillo 2007).

**Gráfico 13 – Variação das contagens diferenciais de eosinófilos (A), monócitos (B) e basófilos (C) (%) e respetivos desvios-padrão, entre maio e agosto.**



Ao analisar separadamente os parâmetros hematológicos dos animais infetados e não infetados, observou-se nos animais infetados uma contagem de leucócitos superior ( $6,8 \pm DP 3,5 \times 10^9$ ) àqueles livres de parasitas gastrointestinais ( $5,31 \pm DP 2,9 \times 10^9$ ), a qual, no entanto, não se revelou ser significativa (ANOVA unilateral teve como resultados  $F=0,98$  e  $p=0,32$ ). Nenhum outro parâmetro exibiu variância estatisticamente significativa entre estas duas populações. No geral, a alteração expectável num coelho com quadro inflamatório é apenas na proporção neutrófilos/linfócitos, surgindo neutrofilia e linfopenia, ocorrendo leucocitose apenas raramente (Melillo 2007). Seria de esperar, na população parasitada, estas alterações, no entanto, tal não se verificou de forma estatisticamente significativa, tendo sido observada uma proporção mais elevada de neutrófilos comparativamente aos linfócitos (0,74 em animais não infetados, 0,82), no entanto sem neutrofilia e linfopenia. Podia isto dever-se à baixa intensidade de infeção nos animais aos quais se fizeram análises sanguíneas, por não terem sido conseguidas amostras sanguíneas em todos os animais, no entanto as médias de excreção foram sensivelmente iguais ( $3505,0 \pm DP 14584,5$  nos animais sujeitos a análise hematológica, por oposição a  $3387,5 \pm DP 13143,1$  na população inteira). Tendo em conta a variação temporal observada nestes parâmetros, põe-se a hipótese de que a diferença seria significativa para o mês de maio, no qual o rácio neutrófilos/leucócitos é mais elevado, e para o qual a prevalência e excreção parasitárias na população são máximas. Dado existir apenas uma amostra negativa para excreção parasitária neste período cuja fórmula leucocitária foi calculada, não foi possível testar estatisticamente esta hipótese.

Os valores médios para cada parâmetro em animais nos quais se detetou infeção e em animais sem infeção detetada estão comparados na tabela 7.

**Tabela 6 - Comparação entre os valores médios e desvio-padrão dos vários parâmetros hematológicos e entre a população na qual se detetou infeção parasitária gastrointestinal e a população na qual não foi detetada infeção parasitária gastrointestinais.**

	Hematócrito (%)	Eritrócitos ( $\times 10^9$ )	Leucócitos ( $\times 10^9$ )	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Basófilos (%)	Hemoglobina (g/L)
<b>Com Parasitas</b>	$36,3 \pm 7,7$	$5,6 \pm 1,6$	$6,8 \pm 3,5$	$38,3 \pm 17,9$	$8 \pm 8,8$	$46,5 \pm 22,2$	$5,5 \pm 3,6$	$1,9 \pm 2,6$	$10,2 \pm 3,0$
<b>Sem Parasitas (<math>\pm DP</math>)</b>	$35,43 \pm 7,4$	$5,01 \pm 1,4$	$5,31 \pm 2,9$	$35 \pm 14,4$	$9,5 \pm 10,3$	$47,1 \pm 15,2$	$6 \pm 3,8$	$2,5 \pm 2,9$	$9,1 \pm 2,0$

### 3.4. Conclusão

O presente estudo permitiu descrever a epidemiologia parasitária numa população de coelho-bravo em liberdade, no Ribatejo, possibilitando a comparação com estudos realizados noutras regiões bem como estabelecer a sua relação com os parâmetros hematológicos e parasitários.

Os resultados obtidos permitiram observar uma elevada prevalência parasitária, a qual se sabe ter efeito na sobrevivência e condição corporal do coelho-bravo, incluindo na sua suscetibilidade a outras doenças infectocontagiosas (Berto-Morán et al. 2013). Foi notável a baixa condição corporal média da população (13,3), que indica desde já fatores desfavoráveis à sobrevivência do coelho-bravo na região estudada. A menor prevalência de estrongilídeos gastrointestinais comparada com outras populações é, do ponto de vista epidemiológico, notável para esta região, e poderá ter sido em parte devida à menor precipitação no período em causa.

Estabeleceu-se uma relação inédita entre o mês do ano e a contagem absoluta de eritrócitos, a qual estará presumivelmente associada ao clima extremamente seco experienciado nos referidos meses nos quais este valor aumentou e poderá ser mediada por um maior grau de desidratação dos coelhos capturados.

A principal limitação deste tipo de estudo é a relativamente pequena quantidade de amostras analisadas, que dificultaram a observação longitudinal ao longo do ano em estudo. Assim, para melhor compreender a influência destes fatores nos parâmetros avaliados e contrariar esta adversidade, a replicação deste estudo numa área onde o coelho-bravo ocorra em densidades populacionais mais elevadas, poderá ser um primeiro passo para melhor desenvolver este estudo e cumprir os objetivos propostos.

É escassa a literatura referente à parasitologia e hematologia do coelho-bravo, e em particular em Portugal, onde os poucos estudos anteriores que analisaram populações selvagens procuraram apenas identificar espécies ou analisar prevalências, desprezando parâmetros biométricos e hematológicos. A recente implementação do programa de controlo da DHV, embora conjugue dados virológicos, bacteriológicos, parasitários e serológicos, foi feita de forma transversal, não permitindo a análise temporal destes dados.

Assim, embora limitado, o presente estudo, que totalizou 121 capturas de coelho, tem relevância no panorama nacional da investigação relativa ao coelho-bravo, bem como no panorama mundial do estudo dos parâmetros fisiológicos em populações selvagens, e influência das condições ambientais nos mesmos parâmetros e na prevalência de doenças infetocontagiosas.

A sua continuação, amplificação e aperfeiçoamento durante os próximos anos deverá permitir estabelecer uma base de dados considerável. Esta será essencial na análise longitudinal demográfica, por forma a determinar causas de mortalidade sazonal e influência de parâmetros fisiológicos, como sexo, idade, condição corporal e stress, na suscetibilidade

a agentes patogénicos, e assim contribuir para a necessária recuperação desta espécie-chave.

#### 4. Bibliografía

- Abrantes J, Lopes AM, Dalton KP, Melo P, Correia JJ, Ramada M, Alves PC, Parra F, Esteves PJ. 2013. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013. *Emerg Infect Dis.* 19(11):1900–1902.
- Abrantes J, Van Der Loo W, Le Pendu J, Esteves, PJ. 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Veterinary research*, 43(1), 12.
- Absher M. 1973. Hemocytometer Counting. *Tissue Culture*, 395–397.
- Alda F, Gaitero T, Suárez M, Merchán T, Rocha G, Doadrio, I. 2010. Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 347.
- Anderson RC. 2000. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. United kingdom: CABI.
- Arthur CP, Louzis C. 1988. la myxomatose du lapin en France: une revue. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 7, 937–957
- Audebert F, Cassone J, Kerboeuf D, Durette-Desset MC. 2002. The life cycle of *Nematodiroides zembrae* (Nematoda, Trichostrongylina) in the rabbit. *The Journal of parasitology*, 898-904.
- Audebert F, Hoste H, Durette-Desset MC. 2002. Life cycle of *Trichostrongylus retortaeformis* in its natural host, the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of helminthology*, 76(3), 189-192.
- Audebert F, Vuong PN, Durette-Desset MC. 2003. Intestinal migrations of *Trichostrongylus retortaeformis* (Trichostrongylina, Trichostrongylidae) in the rabbit. *Veterinary parasitology*, 112(1-2), 131-146.
- Barcia JJ. 2007. The Giemsa stain: its history and applications. *International journal of surgical pathology*, 15(3), 292-296.
- Bautista A, Martínez-Gómez M, Hudson R. 2008. Mother-young and within-litter relations in the European rabbit *Oryctolagus cuniculus*. In: *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology and Conservation*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 211–224
- Bautista MG, Mañes AM, Peña ML. 1999. Parte VII: Parasitosis del conejo. Parasitosis del aparato digestivo y respiratorio (pp 729-741) *Parasitología Veterinaria McGraw-Hill-Interamericana de España, SAU*.
- Benson KG, Paul-Murphy J. 1999. Clinical pathology of the domestic rabbit: acquisition and interpretation of samples. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 2(3), 539-551.
- Bertó-Moran A, Pacios I, Serrano E, Moreno S, Rouco C. 2013. Coccidian and nematode infections influence prevalence of antibody to myxoma and rabbit hemorrhagic disease viruses in European rabbits. *Journal of wildlife diseases*, 49(1), 10-17.
- Bird P, Mutze G, Peacock D, Jennings S. 2012. Damage caused by low-density exotic herbivore populations: the impact of introduced European rabbits on marsupial herbivores and *Allocasuarina* and *Bursaria* seedling survival in Australian coastal shrubland. *Biological Invasions*, 14(3), 743-755.
- BirdLife International 2017. *Aquila adalberti* (amended version of 2016 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2017
- Blasco S, Torres J, Feliu C, Casanova JC, Miquel J, Moreno S. 1996. The helminthfauna of *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) in the Iberian Peninsula. Faunistic and ecological considerations. *Parasite*, 3(4), 327-333.
- Boag B. 1988. Observations on the seasonal incidence of myxomatosis and its interactions with helminth parasites in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 24(3), 450-455.
- Bowman DD, Coles TB, Eberhard ML, Lightowler MW, Lynn RC, Little SE. 2014. *Georgis' parasitology for veterinarians 10th edition*. Sant Louis: Elsevier.
- 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*, 85(4), 307-317.
- Cabezas S, Calvete C, Moreno S. 2006. Vaccination success and body condition in the European wild rabbit: applications for conservation strategies. *The Journal of wildlife management*, 70(4), 1125-1131.
- Cabezas-Díaz S, Lozano J, Virgós E. 2009. The declines of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain: redirecting conservation efforts. *Handbook of nature conservation: global, environmental and economic issues*, 283-310.
- Calvete C, Angulo E, Estrada R. 2005. Conservation of European wild rabbit populations when hunting is age and sex selective. *Biological Conservation*, 121(4), 623-634.

- Calvete C, Estrada R, Osacar JJ, Lucientes J, Villafuerte R. 2004. Short-term negative effects of vaccination campaigns against myxomatosis and viral hemorrhagic disease (VHD) on the survival of European wild rabbits. *The Journal of wildlife management*, 68(1), 198-205.
- Calvete C, Estrada R, Villafuerte R, Osacar JJ, Lucientes J. 2002. Epidemiology of viral haemorrhagic disease and myxomatosis in a free-living population of wild rabbits. *Veterinary Record*, 150(25), 776-782.
- Carro F, Ortega M, Soriguer RC. 2019. Is restocking a useful tool for increasing rabbit densities?. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00560.
- Carvalho C, Duarte E, Monteiro J, Afonso C, Pacheco J, Carvalho P, Mendonça P, Botelho A, Albuquerque T, Themudo P, et al. (2017). Progression of rabbit haemorrhagic disease virus 2 upon vaccination in an industrial rabbitry: a laboratorial approach. *World Rabbit Science*, 25(1), 73-85.
- Carvalho, JC, Gomes P. 2004. Influence of herbaceous cover, shelter and land cover structure on wild rabbit abundance in NW Portugal. *Acta Theriologica*, 49(1), 63-74.
- Cattadori IM, Albert R, Boag B. 2007. Variation in host susceptibility and infectiousness generated by co-infection: the myxoma–*Trichostrongylus retortaeformis* case in wild rabbits. *Journal of the Royal Society Interface*, 4(16), 831-840.
- Chapman JA, Flux JEC. 2008 Introduction to the Lagomorpha. In: *Lagomorph Biology: Evolution Ecology and Conservation*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1–12
- Chylinski C, Boag B, Stear MJ, Cattadori IM. 2009. Effects of host characteristics and parasite intensity on growth and fecundity of *Trichostrongylus retortaeformis* infections in rabbits. *Parasitology*, 136(1), 117-123.
- Companhia das Lezírias. [data desconhecida]. Gestão Florestal Sustentável [Internet]. Samora Correia, Portugal [acedido em 2 de setembro de 2019]. <https://www.cl.pt/areas-de-atividade/gestao-florestal-sustentavel>
- Cooke B. 2008. Managing the European rabbit: converging interests between Australian research for rabbit control and European research for their conservation. In *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology and Conservation* (pp. 317-326). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Correia O, Mexia T. 2011. Diversidade de plantas vasculares na Companhia das Lezírias - Avaliação da diversidade de plantas vasculares e identificação /cartografia de espécies e habitats prioritários na área da Companhia das Lezírias. CBA (FCUL)/SPECO, Lisboa
- Cox TE, Strive T, Mutze G, West P, Saunders G. 2013. Benefits of Rabbit Biocontrol in Australia. In: *PestSmart Toolkit publication*. Canberra, Australia: Invasive Animals Cooperative Research Centre.
- De Santana BB, da Silva TLB, Ramos RAN, Alves LC, de Carvalho GA. 2015. Evaluation of different parasitological techniques for diagnosing intestinal parasites in dogs. *Open J Vet Med*, 2, 19-24.
- Delibes-Mateos M, Delibes M, Ferreras P, Villafuerte R. 2008. Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. *Conservation Biology*, 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 review*, 39(2), 124-140.
- Delibes-Mateos M, Redpath SM, Angulo E, Ferreras P, Villafuerte R. 2007. Rabbits as a keystone species in southern Europe. *Biological Conservation*, 137(1), 149-156.
- Delibes-Mateos M, Villafuerte R, Cooke BD, Alves PC. 2018 *Oryctolagus cuniculus*. In: *Lagomorphs: pikas, rabbits and hares of the world* (pp. 99-104) JHU press.
- Denegri GM. 1993. Review of oribatid mites as intermediate hosts of tapeworms of the Anoplocephalidae. *Experimental & Applied Acarology*, 17(8), 567-580.
- Despacho n.º 4757/2017 Diário da República, 2.ª série — N.º 105 — 31 de maio de 2017
- Devillard S, Aubineau J, Berger F, Léonard Y, Roobrouck A, Marchandeau S. 2008. Home range of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in three contrasting French populations. *Mammalian Biology*, 73(2), 128-137.
- Direção-Geral do Território. c2019. Visualizador da Mapas Online. [Internet]. Lisboa, Portugal. [Acedido em 7 de agosto de 2019]. <http://mapas.dgterritorio.pt/viewer/index.html>
- Dudzinski ML, Mykytowycz R. 1963. Relationship between sex and age of rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.) and infection with nematodes *Trichostrongylus retortaeformis* and *Graphidium strigosum*. *The Journal of Parasitology*, 49 (1) 55-59.
- Duffy SG, Fairley JS, O'Donnell G. 1996. Food of rabbits *Oryctolagus cuniculus* on upland grasslands in Connemara. In *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* (pp. 69-75). Royal Irish Academy.
- Duszynski DW, Couch L. 2013. The biology and identification of the Coccidia (Apicomplexa) of rabbits of the world. Saint Louis: Elsevier.

- Eira C, Torres J, Miquel J, Vingada J. 2007. The helminth parasites of the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* and their effect on host condition in Dunas de Mira, Portugal. *Journal of helminthology*, 81(3), 239-246.
- Elsworth P, Cooke BD, Kovaliski J, Sinclair R, Holmes EC, Strive T. 2014. Increased virulence of rabbit haemorrhagic disease virus associated with genetic resistance in wild Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Virology*, 464, 415-423.
- Elsworth PG, Kovaliski J, Cooke BD. 2012. Rabbit haemorrhagic disease: are Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) evolving resistance to infection with Czech CAPM 351 RHDV?. *Epidemiology & Infection*, 140(11), 1972-1981.
- Feldman DB, Seely JC. 1988. *Necropsy Guide: rodents and the rabbit*. CRC Press.
- 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* (pp. 207-235). Springer, Dordrecht.
- Ferrand N. 2008. Inferring the evolutionary history of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from molecular markers. In: *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology and Conservation*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 47-64
- 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.
- Ferreira C, Alves PC. 2009. Influence of habitat management on the abundance and diet of wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*) populations in Mediterranean ecosystems. *European Journal of Wildlife Research*, 55(5), 487-496.
- Ferreira C, Delibes-Mateos M. 2010. Wild rabbit management in the Iberian Peninsula: state of the art and future perspectives for Iberian lynx conservation. *Wildlife Biology in Practice*, 6(3), 48-66.
- Foronda P, Valladares B, Lorenzo-Morales J, Ribas A, Feliu C, Casanova JC. 2003. Helminths of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Macaronesia. *Journal of Parasitology*, 89(5), 952-958.
- Gálvez L, López-Pintor A, Miguel JM, Alonso G, Rueda M, Rebollo S, Gómez-Sal A. 2008. Ecosystem engineering effects of European rabbits in a Mediterranean habitat. In: *Lagomorph Biology* (pp. 125-139). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Gonçalves H, Alves PC, Rocha A. 2002. Seasonal variation in the reproductive activity of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*) in a Mediterranean ecosystem. *Wildlife Research*, 29(2), 165-173.
- Gonçalves P, Simões J, Ala L. 2014. *Companhia das Lezírias: a gestão florestal em prol da biodiversidade*. Candidatura aos Green Project Awards – Portugal. Samora Correia, Companhia das Lezírias.
- González-Redondo P. 2013. Growth during the first ten months of age in cage-bred wild rabbits. *Giornate di Coniglicoltura ASIC 2013*, 69-72
- Guitton JS, Devillard S, Guénézan M, Fouchet D, Pontier D, Marchandeau S. 2008. Vaccination of free-living juvenile wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) against myxomatosis improved their survival. *Preventive veterinary medicine*, 84(1-2), 1-10.
- Hein J, Hartmann K. 2003. [Reference ranges for laboratory parameters in rabbits]. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere*, 31(5), 321-328. (Em alemão).
- Henning J, Meers J, Davies PR, Morris RS. 2005. Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. *Epidemiology & Infection*, 133(4), 719-730.
- Henriksen SA. & Aagaard K. 1976. A simple flotation and McMaster method (author's transl). *Nordisk veterinærmedicin*, 28(7-8), 392-397
- Hobbs RP, Twigg LE, Elliot AD, Wheeler AG. 1999. Factors influencing the fecal egg and oocyst counts of parasites of wild European rabbits *Oryctolagus cuniculus* (L.) in Southern Western Australia. *The Journal of parasitology*, 796-802.
- Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. 1934. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansonii. *Puert. Rico J. Publ. Health Trop. Med.* 9, 283-298
- INIAV. c2019. Mais Coelho em Notícia [Internet]. Oeiras, Portugal. [Acedido em 24 de agosto de 2019]. <http://www.inia.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos/mais-coelho-em-noticia>
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera. c2019. O clima [Internet]. Lisboa, Portugal. [Acedido em 26 de agosto de 2019]. <https://www.ipma.pt/pt/oclima>
- Jeklova E, Leva L, Knotigova P, Faldyna M. 2009. Age-related changes in selected haematology parameters in rabbits. *Research in veterinary science*, 86(3), 525-528.
- Kerr PJ, Best SM. 1998. Myxoma virus in rabbits. *Revue scientifique et technique-Office international des epizooties*, 17, 256-264.
- Kerr PJ. 2012. Myxomatosis in Australia and Europe: a model for emerging infectious diseases. *Antiviral research*, 93(3), 387-415.

- Lavazza A, Capucci, L. 2008. How many caliciviruses are there in rabbits? A review on RHDV and correlated viruses. In: Lagomorph Biology Evolution, Ecology and Conservation. Springer, Berlin Heidelberg New York. pp. 263-278.
- Lees AC, Bell DJ. 2008. A conservation paradox for the 21st century: the European wild rabbit *Oryctolagus cuniculus*, an invasive alien and an endangered native species. *Mammal Review*, 38(4), 304-320.
- Leineweber C, Müller E, Marschang RE. 2018. Blood reference intervals for rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from routine diagnostic samples. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere*, 46(06), 393-398.
- Lombardi L, Fernández N, Moreno S, Villafuerte R. 2003. Habitat-related differences in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) abundance, distribution, and activity. *Journal of Mammalogy*, 84(1), 26-36.
- Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, Galeotti M, Della Salda L, Sarli G, Lucidi P. 1991. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech*, 10(2), 371-392.
- Marhoon IA., Mattar KT, Mohammad FI. 2018. Parasitic Infection in Wild Rabbits *Oryctolagus Cuniculus*. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 13, 5.
- Marques C, Mathias ML. 2001. The diet of the European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.), on different coastal habitats of Central Portugal. *Mammalia*, 65(4), 437-450.
- Marshall KL. 2008. Rabbit hematology. *Veterinary clinics of North America: exotic animal practice*, 11(3), 551-567.
- Massoni J, Cassone J, Durette-Desset MC, Audebert F. 2011. Development of *Graphidium strigosum* (Nematoda, Haemonchidae) in its natural host, the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and comparison with several Haemonchidae parasites of ruminants. *Parasitology research*, 109(1), 25-36.
- McCallum H. 2015. Models for managing wildlife disease. *Parasitology*, 143(7), 805-820.
- Mehlhorn H (editor). 2016. *Encyclopedia of Parasitology Fourth Edition*. Berlin: Springer.
- Melillo A. 2007. Rabbit clinical pathology. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 16(3), 135-145.
- Melillo A. 2013. Special issue: Clinical and Diagnostic Pathology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice Vol.16 No.1 pp.ix-x + 1-225*
- Mikschofsky H, Schirrmeier H, Keil GM, Lange B, Polowick PL, Keller W, Broer I. 2009. Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus. *Plant biotechnology journal*, 7(6), 537-549.
- Molina X, Casanova JC, Feliu C. 1999. Influence of host weight, sex and reproductive status on helminth parasites of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, in Navarra, Spain. *Journal of helminthology*, 73(3), 221-225.
- Monk KA. 1989. Effects of diet composition on intake by adult wild European rabbits. *Appetite*, 13(3), 201-209.
- Muller A, Freitas J, Silva E, Le Gall-Recule G, Zwingelstein F, Abrantes J, Esteves PJ, Alves PC, Van der Loo W, Kolodziejek J, et al. 2009. Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from the Iberian Peninsula. *Veterinary microbiology*, 135(3-4), 368-373.
- Neimanis A, Pettersson UL, Huang N, Gavier-Widén D, Strive T. 2018. Elucidation of the pathology and tissue distribution of *Lagovirus europaeus* Gl. 2/RHDV2 (rabbit haemorrhagic disease virus 2) in young and adult rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary research*, 49(1), 46.
- Ohlinger VF, Haas BE, Meyers G, Weiland F, Thiel HJ. 1990. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *Journal of Virology*, 64(7), 3331-3336.
- Paiva R (coord.), Reis P, Coelho IS. 2017. Valor económico da caça em Portugal (Silva Lusitana. Caderno técnico; 1) - 43 p.: il. ; 24 cm - INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Oeiras - ISBN 978-972-579-044-1.
- Queiroz AI (coord.), Alves PC, Barroso I, Beja P, Fernandes M, Freitas L, Mathias ML, Mira A., Palmeirim, J.M., Prieto, R., Rainho, et al. 2005. *Oryctolagus cuniculus*. Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal.
- Rinaldi L, Russo T, Schioppi M, Pennacchio S, Cringoli G. 2007. *Passalurus ambiguus*: new insights into copromicroscopic diagnosis and circadian rhythm of egg excretion. *Parasitology research*, 101(3), 557-561.
- Rödel HG, Monclús R, von Holst D. 2006. Behavioral styles in European rabbits: social interactions and responses to experimental stressors. *Physiology & behavior*, 89(2), 180-188.
- Rödel HG, von Holst D. 2008. Weather effects on reproduction, survival, and body mass of European rabbits in a temperate zone habitat. In: *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology and Conservation*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 115–124

- Rödel HG. 2005. Winter feeding behaviour of European rabbits in a temperate zone habitat. *Mammalian Biology*, 70(5), 300-306.
- Rodríguez A, Calzada J. 2015. *Lynx pardinus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015
- Ruedas LA, Mora JM, Lanier HC. 2018. Evolution of lagomorphs. In: *Lagomorphs: pikas, rabbits and hares of the world* (pp. 4-8). Baltimore, MD, USA: JHU press.
- Santos N, Alves PC. 2019. Monitorização demográfica e epidemiológica longitudinal de uma população-sentinela de coelho bravo na Companhia das Lezírias - Relatório de actividades 2018. Vairão, Portugal. CIBIO
- Saunders G, Cooke B, McColl K, Shine R, Peacock T. 2010. Modern approaches for the biological control of vertebrate pests: an Australian perspective. *Biological control*, 52(3), 288-295.
- Silva SM, Ferreira C, Paupério J, Silva RM, Alves PC, Lemos A. 2015. Coccidiosis in European rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*) populations in the Iberian Peninsula. *Acta parasitologica*, 60(2),
- Soriguer RC, Palacios F. 1994. Los lagomorfos ibéricos: Liebres y Conejos. Curso de gestión y ordenación cinegética, 63-82.
- Soriguer RC. 1980. El Conejo, *Oryctolagus cuniculus* (L.), en Andalucía occidental: parámetros corporales y curva de crecimiento. Doñana, *Acta Vertebrata*, 7 (1): 83-90.
- Soriguer RC. 1988. Alimentación del conejo (*Oryctolagus cuniculus* L. 1758) en Doñana, SO, España. Doñana, *Acta Vertebrata*, 15(1), 141-150.
- Sweet H, Pearson A, Watson P, German A. 2013. A novel zoometric index for assessing body composition in adult rabbits. *Veterinary Record*, 173(15).
- Szkucik K, Pyz-Łukasik R, Szczepaniak KO, Paszkiewicz W. 2014. Occurrence of gastrointestinal parasites in slaughter rabbits. *Parasitology research*, 113(1), 59-64.
- Tablado Z, Revilla E, Palomares F. 2012. Dying like rabbits: general determinants of spatio-temporal variability in survival. *Journal of Animal Ecology*, 81(1), 150-161.
- Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ. 1979. Diagnosing helminthiasis through coprological examination. Beerse, Belgium: Janssen Research Foundation.
- Virgós E, Cabezas-Díaz S, Lozano J. 2007. Is the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) a threatened species in Spain? Sociological constraints in the conservation of species. *Biodiversity and Conservation*, 16(12), 3489-3504.
- Von BWE. 1975. U.S. Patent No. 3,914,985. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Watson JS, Tyndale-Biscoe CH. 1953. The apophyseal line as an age indicator for the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *New Zealand Journal of Science and Technology B*, 34, 427-435.
- Williams CK, Parer I, Coman BJ, Burley J, Braysher ML. 1995. *Managing vertebrate pests: rabbits*. Canberra: Australian Government Publishing Service.
- Willis HH. 1921. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal of Australia*, 2(18).
- Xu ZJ, Chen WX. 1989. Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review. *Veterinary research communications*, 13(3), 205-212.
- Zander R, Lang W, Wolf HU. 1984. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I. Description of the method. *Clinica chimica acta*, 136(1), 83-93.

Anexo 1 – Ficha de Captura

Nº microchip	Recaptura	Espécie	CAPTURA
		<i>Cryptotagus cuniculus</i>	<b>141</b>

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora: \_\_\_:\_\_\_ ID armadilha: \_\_\_\_\_  
 Temp. ambiente: \_\_\_ °C Chuva: 0 1 2 Vento: 0 1 2

Idade	Juvenil	<input type="checkbox"/>	Adulto	<input type="checkbox"/>
Sexo	Fêmea	<input type="checkbox"/>	Macho	<input type="checkbox"/>
	Sim	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>
Cio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Testículos escrotais	<input type="checkbox"/>
Lactante	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Mamilo visíveis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Prenha	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Palpação lombar	0 1 2

	Medida		Medida
Peso coelho + saco	g	Comprimento orelha	mm
Peso saco	50 g	Largura cabeça	mm
Comprimento tarso	mm	Comprimento total	mm

Nº fezes na armadilha  Nº carraças no corpo

Amostra	ID	Contator	Quantidade indicada	Volume	Nº de tubos
Sangue total	Seda	Tubo com EDTA	0,25 ml <sup>(1)</sup>		
Sangue total	Scoa	Tubo de coagulação	1-3 ml <sup>(1)</sup>		
Zaragatoa rectal	Zrec	Simplex	2		
Zaragatoa vaginal	Zvag	Simplex	1		
Zaragatoa oronasal	Zoron	Simplex	1		
Zaragatoa conjuntival	Zcon	Simplex	1		
Fezes (nº de fezes)	Fez	Simplex	Máximo		
Biópsia orelha	Eor	Tubo com álcool 96%	1		
Pelo	Pelo	Simplex	2 madexas		
Carraças	Car	Simplex			
Pulgas	Pul	Simplex			

<sup>(1)</sup> O volume total de sangue a colher não pode ultrapassar 0,25% do peso total do animal

	NE	N	L	Descrição de eventuais lesões
Exterior & mucosas				
Músculo-esquelético				

NE – não examinado; N – sem lesões; L – com lesões

Observações

Equipa: \_\_\_\_\_

Anexo 2 – Ficha de hematologia

FICHA DE RESULTADOS LABORATORIAIS  
 Actualizada 19/08/2018

Identificação: \_\_\_\_\_ Espécie: *Oryctolagus cuniculus* Data recolha: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Data análise: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Hematócrito: \_\_\_\_\_ % Total (mm): \_\_\_\_\_ Células (mm): \_\_\_\_\_

Data análise: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Contagem de Eritrócitos: \_\_\_\_\_  $10^9/\mu\text{l}$  ( $10^9/\text{ml}$ )

Nº eritr. 5 quadrados "R" câm. 1: \_\_\_\_\_ + Nº eritr. 5 quadrados "R" câm. 2: \_\_\_\_\_

Total de eritrócitos: \_\_\_\_\_ / 200

Contagem de Leucócitos: \_\_\_\_\_  $10^3/\mu\text{l}$  ( $10^3/\text{ml}$ )

Nº leuc. 4 quadrados "W" câm. 1: \_\_\_\_\_ + Nº leuc. 4 quadrados "W" câm. 2: \_\_\_\_\_

Total leucócitos: \_\_\_\_\_ / 4

Fórmula leucocitária:  
 Neutrófilos: \_\_\_\_\_ Linfócitos: \_\_\_\_\_ Monócitos: \_\_\_\_\_ Eosinófilos: \_\_\_\_\_ Basófilos: \_\_\_\_\_

Espécie	Nº indivíduos	Nº de campos

Data análise: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Concentração Hemoglobina: \_\_\_\_\_ g/dl  $OD_{580\text{nm}}$  1:1: \_\_\_\_\_  $OD_{580\text{nm}}$  1:2: \_\_\_\_\_

Anexo 3 – Relatórios de necropsia  
Captura nº 73 – causa de morte: predação.



Instituto Nacional de  
Investigação Agrária e  
Veterinária, I.P.

**Relatório de Ensaio**  
**P-PAT-19-02634**

Data e hora de receção da amostra: 20/03/2019 00:00:00

Data de emissão: 02/07/2019

**DESCRIÇÃO DA AMOSTRA**

**Matriz:** Cadáver

**Animal:** Coelho bravo

**Sexo:**

**Idade:** Juvenil

**Raça:**

**Nome:**

**SN/ ID chip:**

**Nº de amostras:** 1

**Data de colheita:** 16/07/2018

**Âmbito da análise:** + COELHO

**Região:** LVT

**MOE:** 73

**Localidade:** Benavente

**CLIENTE**

**Nome:** INAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

**NIF:** 510345271

**Endereço fiscal:** Avenida da República - Quinta do Marquês - Oeiras

**CP:** 2784-505 Oeiras

**e-mail:**

**País:** Portugal

**REQUISITANTE**

**Nome:** Nuno Santos

**Cédula Profissional:** 1970

**e-mail:** pygargusv@sapo.pt

**Tel:** 919252736

**PROPRIETÁRIO/ LOCAL de COLHEITA**

**Nome:** Companhia das Lezírias

**Endereço:** Benavente, Santarém

**DECLARAÇÕES**

1. Os resultados reportam-se exclusivamente às amostras entregues no Laboratório.
2. A informação incluída na "DESCRIÇÃO DA AMOSTRA" é da exclusiva responsabilidade do requerente.
3. O ensaio assinalado com (\*) não está incluído no âmbito da acreditação.
4. A amostragem (colheita) efetuada não se encontra incluída no âmbito da acreditação.

- Processado e validado por Nautilus (TM) 9.3, sendo proibida a reprodução parcial deste documento -

pag. 1 / 2

Mod. G-053

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.  
Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

214403535 / infocliente@inlav.pt



## Relatório de Ensaio P-PAT-19-02634

Data e hora de receção da amostra: 20/03/2019 00:00:00

Data de emissão: 02/07/2019

UEISPSA - Laboratório de Virologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:**

**Método de Ensaio:** \*PE-13-PSAVIR Pesquisa do vírus da Mixomatose (Leporipoxvirus), por PCR em tempo real

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Faguiha **Data de realização:** 10/04/2019

Código e Ref's da amostra	Resultado
P-PAT-19-02634VIR001 - Coelho 2 - Cadáver	Negativa

Nota: Viroológico

UEISPSA - Laboratório de Virologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:**

**Método de Ensaio:** \*PE-20-PSAVIR Pesquisa do vírus da Doença Hemorrágica dos coelhos (RHDV), por RT-PCR

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Faguiha **Data de realização:** 10/04/2019

Código e Ref's da amostra	Resultado
P-PAT-19-02634VIR001 - Coelho 2 - Cadáver	Negativa

Nota: Viroológico

UEISPSA - Laboratório de Virologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:**

**Método de Ensaio:** \*PE-21-PSAVIR Pesquisa do vírus da Doença Hemorrágica dos coelhos (RHDV2), por RT-PCR tempo real

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Albuquerque **Data de realização:** 10/04/2019

Código e Ref's da amostra	Resultado
P-PAT-19-02634VIR001 - Coelho 2 - Cadáver	Negativa

Nota: Viroológico

UEISPSA - Laboratório de Bacteriologia e Micologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:** Bacteriológico

**Método de Ensaio:** \*Exame Bacteriológico

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Albuquerque **Data de realização:** 25/03/2019

Código e Ref's da amostra	Resultado
P-PAT-19-02634/DB/001 - Coelho 2 - Cadáver	Não se isolaram bactérias patogénicas específicas em aerobiose

Nota: Bacteriológico

Autorizado por  
Cristina Ochoa  
(em substituição do Diretor da UEISPSA)

Captura nº118 – Causa de morte: Vírus da Doença Hemorrágica Viral 2.



**Relatório de Ensaio**  
**P-PAT-19-02633**

Data e hora de receção da amostra: 20/03/2019 00:00:00

Data de emissão: 02/07/2019

**DESCRIÇÃO DA AMOSTRA**

Matriz: Cadáver

Animal: Coelho bravo

Sexo:

Idade: Adulto

Raça:

Nome:

SIA / ID chip:

Nº de amostras: 1

Data de colheita: 31/01/2019

Âmbito da análise: + COELHO

Região: LVT

MOE: 118

Localidade: Benavente

**CLIENTE**

Nome: INAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Endereço fiscal: Avenida da República - Quinta do Marquês - Oeiras

e-mail:

NIF : 510345271

CP : 2784-505 Oeiras

País: Portugal

**REQUISITANTE**

Nome : Nuno Santos

e-mail : pygargusv@sapo.pt

Cédula Profissional : 1970

Tel : 919252736

**PROPRIETÁRIO / LOCAL de COLHEITA**

Nome : Companhia das Lazéras

Endereço : Benavente, Santarém

**DECLARAÇÕES**

1. Os resultados reportam-se exclusivamente às amostras entregues no Laboratório.
2. A informação incluída na "DESCRIÇÃO DA AMOSTRA" é da exclusiva responsabilidade do requerente.
3. O ensaio assinalado com (\*) não está incluído no âmbito da acreditação.
4. A amostragem (colheita) efetuada não se encontra incluída no âmbito da acreditação.



## Relatório de Ensaio P-PAT-19-02633

Data e hora de receção da amostra: 20/03/2019 00:00:00

Data de emissão: 02/07/2019

UEISPSA - Laboratório de Patologia - Anatomohistopatologia e EET's ↔ Rua dos Lagidos, Lugar da Madalena 4485-655 Valrião

### Análises Requeridas:

Método de Ensaio: \*Exame Anatomopatológico

Técnico Responsável pelo Ensaio: Cristina Ochoa

Data de realização: 03/04/2019

### Código e Ref's da amostra

P-PAT-19-02633/P.APH-H001 - Coelho 1 - Cadáver

### Resultado

Identificação do animal: Coelho bravo, nº recolta 118, adulto, género feminino, recebido congelado, encontrado morto.

-Hábito externo: Estado geral de boa conformação e bom estado de pelagem. Ectoparasitas (xodódeos e pulgas).

-Olhos e pavilhões auriculares: Congestão das conjuntivas. Exsudado branco grumoso nos condutos auditivos (otte bilateral).

-Cavidade oral: Bom estado da dentição. Vestígios de alimento no pós-boca (erva).

-Trato respiratório: Laringe congestionada, com coágulos. Traqueia com mucosa severamente hemorrágica, conteúdo de sangue, continuando nos grandes brônquios. Pulmões difusamente vermelhos, superfície lisa e muito brilhante com ralados mais consolidados, vermelhos escuros, escotom abundante sangue na superfície de corte.

-Coração: Epicárdio embebido em hemoglobina

-Trato digestivo: Estômago com mucosa pálida. Estômago repleto de alimento. (Não se avaliou o conteúdo gastro-intestinal pela colheita de estômago e intestino para estudo de investigação).

-Pâncreas: coloração rosada.

-Fígado: Coloração castanho claro, superfície lisa e brilhante. Repleção da vesícula biliar.

-Glândulas endócrinas: Tiroídes e adrenais sem alterações macroscópicas significativas.

-Bazo: Bordos arredondados.

-Trato urinário: Rins de coloração rosada, típicos de descapsular. Bexiga distendida, contendo urina límpida.

-Sistema genital: Útero gravídico com 4 embriões.

CONCLUSÃO: Quadro lesional de traqueite hemorrágica, sugestivo de doença vírica hemorrágica dos coelhos.

UEISPSA - Laboratório de Virologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

### Análises Requeridas:

Método de Ensaio: \*PE-13-PSA/VIR Pesquisa do vírus da Mixomatose (Leporipoxvirus), por PCR em tempo real

Técnico Responsável pelo Ensaio: Teresa Fagúña

Data de realização: 10/04/2019

### Código e Ref's da amostra

P-PAT-19-02633/VIR001 - Coelho 1 - Cadáver

Resultado

Negativa

Nota: Viroológico

## Relatório de Ensaio P-PAT-19-02633

Data e hora de receção da amostra: 20/03/2019 00:00:00

Data de emissão: 02/07/2019

UEISPSA - Laboratório de Virologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:**

**Método de Ensaio:** \*FE-20-PSAV/IR Pesquisa do vírus da Doença Hemorrágica dos coelhos (RHDV), por RT-PCR

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Fagulha **Data de realização:** 10/04/2019

**Código e Refs da amostra** **Resultado**

P-PAT-19-02633/IR/001 - Coelho 1 - Cadáver **Negativa**

Nota: Virologico

UEISPSA - Laboratório de Virologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:**

**Método de Ensaio:** \*FE-21-PSAV/IR Pesquisa do vírus da Doença Hemorrágica dos coelhos (RHDV2), por RT-PCR tempo real

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Fagulha **Data de realização:** 10/04/2019

**Código e Refs da amostra** **Resultado**

P-PAT-19-02633/IR/001 - Coelho 1 - Cadáver **Positiva**

Nota: Virologico

UEISPSA - Laboratório de Bacteriologia e Micologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:** Bacteriológico

**Método de Ensaio:** \*Exame Bacteriológico

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Albuquerque **Data de realização:** 25/03/2019

**Código e Refs da amostra** **Resultado**

P-PAT-19-02633/DB/001 - Coelho 1 - Cadáver **Não se isolaram bactérias patogénicas específicas em aeróbios**

Nota: Bacteriológico

Autorizado por  
Cristina Ochoa  
(em substituição do Diretor da UEISPSA)

Captura nº0 / nula – causa de morte: predação.



## Relatório de Ensaio P-PAT-19-02635

Data e hora de receção da amostra: 20/03/2019 00:00:00

Data de emissão: 02/07/2019

### DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Matriz: Cadáver

Animal: Coelho bravo

Sexo:

Idade:

Raça:

Nome:

SA / ID chip:

Nº de amostras: 1

Data de colheita: 21/05/2019

Âmbito da análise: + COELHO

Região: LVT

MOE:

Localidade: Benavente

### CLIENTE

Nome: INAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP

NIF : 510345271

Endereço fiscal: Avenida da República - Quinta do Marquês - Oeiras

CP : 2784-505 Oeiras

e-mail :

País: Portugal

### REQUISITANTE

Nome : Nuno Santos

Cédula Profissional : 1970

e-mail : pygatgusv@tspao.pt

Tel : 919252736

### PROPRIETÁRIO / LOCAL de COLHEITA

Nome : Companhia das Lezírias

Endereço : Benavente, Santarém

### DECLARAÇÕES

1. Os resultados reportam-se exclusivamente às amostras entregues no Laboratório.
2. A informação incluída na "DESCRIÇÃO DA AMOSTRA" é da exclusiva responsabilidade do requerente.
3. O ensaio assinalado com (\*) não está incluído no âmbito da acreditação.
4. A amostragem (colheita) efetuada não se encontra incluída no âmbito da acreditação.



## Relatório de Ensaio P-PAT-19-02635

Data e hora de receção da amostra: 20/03/2019 00:00:00

Data de emissão: 02/07/2019

UEISPSA - Laboratório de Virologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:**

**Método de Ensaio:** \*PE-13-PSAVIR Pesquisa do vírus da Mixomatose (Leporipoxvirus), por PCR em tempo real

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Faguiha **Data de realização:** 10/04/2019

Código e Ref's da amostra	Resultado
P-PAT-19-02635/VIR/001 - Coelho 3 - Cadáver	Negativa

Nota: Virologico

UEISPSA - Laboratório de Virologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:**

**Método de Ensaio:** \*PE-20-PSAVIR Pesquisa do vírus da Doença Hemorrágica dos coelhos (RHDV), por RT-PCR

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Faguiha **Data de realização:** 10/04/2019

Código e Ref's da amostra	Resultado
P-PAT-19-02635/VIR/001 - Coelho 3 - Cadáver	Negativa

Nota: Virologico

UEISPSA - Laboratório de Virologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:**

**Método de Ensaio:** \*PE-21-PSAVIR Pesquisa do vírus da Doença Hemorrágica dos coelhos (RHDV2), por RT-PCR tempo real

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Faguiha **Data de realização:** 10/04/2019

Código e Ref's da amostra	Resultado
P-PAT-19-02635/VIR/001 - Coelho 3 - Cadáver	Negativa

Nota: Virologico

UEISPSA - Laboratório de Bacteriologia e Micologia ↔ Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras

**Análises Requeridas:** Bacteriológico

**Método de Ensaio:** \*Exame Bacteriológico

**Técnico Responsável pelo Ensaio:** Teresa Albuquerque **Data de realização:** 25/03/2019

Código e Ref's da amostra	Resultado
P-PAT-19-02635/DB/001 - Coelho 3 - Cadáver	Não se isolaram bactérias patogénicas específicas em aerobiose

Nota: Bacteriológico

Autorizado por  
Cristina Ochoa  
(em substituição do Diretor da UEISPSA)

Anexo 4 – Publicação, em formato de Póster, dos resultados preliminares deste estudo, apresentada em junho de 2019 no Congresso “Wildlife and Game Management Summit 2019”.

## ESTUDO LONGITUDINAL DO PARASITISMO GASTROINTESTINAL EM COELHOS BRAVOS (*Oryctolagus cuniculus algirus*) NO SUL DE PORTUGAL – RESULTADOS PRELIMINARES

Santos, N.<sup>1</sup>, Abreu, I.<sup>1,2</sup>, Madeira de Carvalho, L. M.<sup>2</sup>



1. CIBIO/InBIO, Campus de Vairão, 4485-661 Vairão, nuno.santos@cibio.up.pt

2. CIISA – Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal, \*Corresponding authors: pygargusv@sapo.pt, madeiracarlovalho@fmv.ulisboa.pt



### INTRODUÇÃO

O coelho bravo é uma espécie-chave nos ecossistemas da Península Ibérica, pelo seu papel ecológico na manutenção de biodiversidade, constituindo a principal presa de diversos predadores, incluindo os ameaçados águia imperial (*Aquila adalbertii*) e linco ibérico (*Lynx pardinus*)<sup>1</sup>. Além do seu papel ecológico, tem também um socioeconómico, ao constituir a espécie sedentária de caça menor com maior importância na Península Ibérica<sup>2,3</sup>. O declínio das suas populações ibéricas nas últimas décadas tem, por isso, sido causa de grande preocupação, e é devido a múltiplas causas, entre as quais as doenças parasitárias<sup>4</sup>. Neste estudo caracterizou-se a infeção parasitária por helmintes e protozoários gastrointestinais numa população de coelho bravo no sul de Portugal, num estudo de tipo longitudinal.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os animais foram capturados com recurso a caixas-armadilha Tomahawk™ (n=53), com iscos com cenoura (Fig. 1), instaladas numa área de 13 hectares, principalmente ocupada por mato e montado de sobreiro. Realizaram-se campanhas de captura com a duração de 4 ou 5 dias, com periodicidade mensal ou bimestral, entre maio de 2018 e maio de 2019. Os coelhos capturados (Fig. 2) foram identificados individualmente com microchip, sendo colhidas amostras fecais frescas no solo do local de captura, quando presentes. Estas foram analisadas pelas técnicas de McMaster, para análise qualitativa e quantitativa diferencial, tendo sido calculadas as taxas de excreção de oocistos ou ovos para cada grupo taxonómico de parasitas; e de flutuação e sedimentação (Fig. 3), para análise qualitativa. A prevalência foi comparada entre classes etárias e sexo (gráfico 1), e estudada a sua evolução temporal (gráfico 2).



### RESULTADOS

Foram analisadas 85 amostras fecais de 44 coelhos bravos, tendo sido obtida uma prevalência parasitária global de 70,3% (IC<sub>95</sub> 60,8–78,3%). Os grupos com maior prevalência de excreção foram as Coccídeos por *Eimeria* sp. (47,5 %, IC<sub>95</sub> 38,1–57,2%), cestódeos Anoplocephalidae (32,7%, IC<sub>95</sub> 24,3 – 42,3%) e nemátodos Strongylidae ou Strongylídeos gastro-intestinais (31,0%, IC<sub>95</sub> 22,8 – 40,6%). A intensidade de eliminação média foi de 7.256 oocistos por grama (máximo 107.250 OoPG), 427 ovos por grama (máximo 2.650 OPG) e 168 ovos por grama (máximo 900 OPG), respetivamente (tabela 1). Foram detetadas prevalências mais elevadas para cada grupo de parasitas em fêmeas e em adultos, havendo uma prevalência maior em juvenis apenas nas coccídeos (Gráfico 1). Ao longo do período de estudo, a prevalência parasitária sofreu uma diminuição no verão, atingindo um mínimo de 57,7% no mês de Agosto de 2018 e um máximo de 92,9% em Maio do mesmo ano (Gráfico 2).

Gráfico 1 – Prevalência (%) dos diferentes géneros parasitários em adultos, juvenis, animais do sexo feminino e animais do sexo masculino.

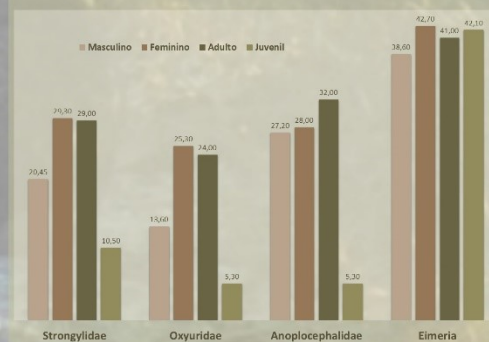
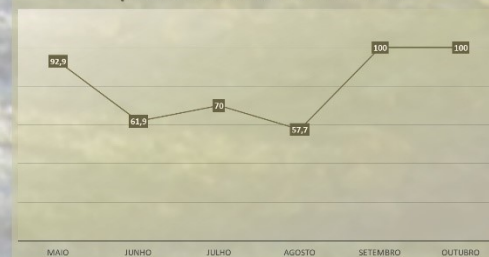


Tabela 1 – Prevalência relativa e total e intensidade de parasitismo obtidas entre Maio de 2018 e Maio de 2019

Grupo taxonómico	Parasita	Prevalência (%) (IC <sub>95</sub> )	Intensidade (OPG/OoPG) ± IC <sub>95</sub>
Strongylidae ou Strongylídeos gastrointestinais		31,0 (22,8 – 40,6)	160 ± 107,3
Nematodes	Oxiuridae	24,8 (17,4 – 34,0)	95 ± 41,5
	<i>Trichuris</i> sp.	1,0 (0,2 – 5,4)	
Cestodes	Anoplocephalidae	32,7 (24,3 – 42,3)	427 ± 301,4
Protozoários	<i>Eimeria</i> sp.	47,5 (38,1 – 57,2)	7256 ± 6243,2
Total (101 amostras)		70,3 (60,8 – 78,3)	3387 ± 2917,4

Gráfico 2 – Evolução da Prevalência Global (%) de parasitas entre Maio e Outubro 2018



### CONCLUSÕES

Como conclusão preliminar, a prevalência global é elevada, sendo no entanto menor que o esperado para Strongylídeos gastrointestinais<sup>5</sup>, o que poderá ser devido ao clima característico da zona ser distintamente mais seco. A excreção de ovos e oocistos obtida foi semelhante a estudos prévios<sup>6</sup>. Devido ao número de capturas ter diminuído significativamente a partir do mês de setembro, considera-se negligenciável do ponto de vista estatístico a prevalência obtida para os meses seguintes (de Novembro de 2018 a Maio de 2019) nos quais foram capturados, no total, 3 coelhos. No entanto, estima-se que a prossecução deste estudo a longo prazo permitirá revelar a contribuição direta e indireta do parasitismo gastrointestinal para a morbidade/mortalidade em populações naturais de coelho bravo.

### Referências

- 1 - Delibes-Mateos, M., Delibes, M., Ferreras, P. & Villafuente, R. 2008. Key role of European rabbits in the conservation of the western Mediterranean Basin Hotspot. *Cons. Biol.* 22: 1106-1117.
- 2 - Virgós, E., Cabezas-Diaz, S. & Llorente, J. 2002. Is the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) a threatened species in Spain? Social-ecological constraints in the conservation of species. *Biodiv. Cons.* 16: 3489-3504.
- 3 - Silva, R., Peix, P. & Coelho, S. 2015. VALOR ECONÓMICO DA CACA EM PORTUGAL. SILVA LUSITANA - Caderno Técnico nº51. INIAV.
- 4 - Delibes-Mateos, M., Ferreras, P. & Villafuente, R. 2009. European rabbit population trends and associated factors: a review of the situation in the Iberian Peninsula. *Mammal Rev.* 2009, Volume 39, No. 2, 124-140.
- 5 - Blasco, S., Torres, J., Feliu, C., Casanova, J. C., Miguel, J., & Moreno, S. (1996). The helminthfauna of *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) in the Iberian Peninsula. Faunistic and ecological considerations. *Parasite*, 3(4), 327-333.
- 6 - Silva, S. M., Ferreira, G., Paupério, J., Silva, R. M., Alves, P. C., & Lemos, A. (2016). Coccidiosis in European rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*) populations in the Iberian Peninsula. *Acta Parasitologica*, 61(2)

Anexo 5- Dados recolhidos dos coelhos-bravos capturados em folha Microsoft Office Excel – Análise hematológica.

ID capt.	ID coelho	ID animal	Recapt.	Ano	Mês	Dia	Hor	Sex	Idad	Age (dal)	Peso	Comp. tarsal	Comp. oreil	Ht	C. eritrócitos	C. leucócitos	% neutróf.	% eosinóf.	% linfóc.	% monóc.	% basóf.	Hb
3	620098100207038	T26	0	2018	5	21	11:00	F	Ad		1650	78	83	38,33	6,67	5,75	67	0,0	20	13	0	13,9
4	620098100222347	T16	0	2018	5	21	11:38	F	Juv	87,24ev	650	69	72	39,65	6,46	5,50	43	0,0	53	8	0	15,9
6	620098100201720	T14	0	2018	5	21	23:55	F	Ad		1150	83	77	44,44	5,95	3,50	54	19,0	19	5	0	11,7
7	620098100219334	T27	0	2018	5	22	00:35	M	Juv	64,23março	500	64	62	34,29	5,64	7,75	55	0,0	48	3	0	9,4
8	620098100219573	T16	0	2018	5	22	08:43	F	Ad		1150	79	73	35,74	6,50	6,50	23	5,0	68	3	1	9,4
10	620098100208933	T21	0	2018	5	22	09:35	M	Ad		1250	78	77	35,81	9,36	6,50	62	8,0	21	9	0	14,2
11	620098100212576	T33	0	2018	5	22	10:10	F	Ad		1250	78	74	29,91	3,21	2,50	28	16,0	50	3	3	5,6
14	620098100206859	T20	0	2018	5	23	23:14	F	Ad		1650	70	76	40,22	8,25	8,25	35	1,0	44	11	1	11,0
15	620098100213561	T16	0	2018	5	24	08:45	M	Ad		1250	74	77	38,54	5,56	8,00	31	26,0	37	7	3,7	9,9
16	620098100206243	T19	1	2018	5	25	00:00	M	Ad		1150	75	75				56	17,0	12	3	3	6,9
17	620098100211633	T11	0	2018	6	23	00:20	F	Juv	71,5abr	550	69	69	28,74	2,83	1,75	36	6,0	43	15	0	7,2
18	620098100210933	T16	0	2018	6	23	08:50	F	Ad		1175	78	74	30,46	3,41	3,00	38	2,0	38	3	1	8,3
19	620098100208412	T10	0	2018	6	23	09:45	M	Ad		1175	78	74	30,46	2,87	1,75	52	2,0	38	3	1	8,3
20	620098100212986	T4	0	2018	6	24	00:10	M	Juv	53,1março	425	61	67	36,67	4,23	1,50	32	14,0	42	6	6	6,5
21	620098100208684	T19	0	2018	6	24	00:55	F	Ad		1050	77	77	41,81	4,93	2,75	38	12,0	46	4	4	12,6
22	620098100207923	T23	0	2018	6	24	09:05	M	Ad		1225	82	78	36,71	5,82	5,00	11	42,0	33	6	8	10,4
25	620098100212726	T20	1	2018	6	24	11:30	F	Ad		1175	82	82	27,64	3,98	5,25	32	1,0	48	10	9	8,9
28	620098100206018	T11	0	2018	6	25	08:45	F	Ad		950	74	74	37,87	3,22	2,75	10	1,0	81	5	3	8,3
29	620098100206508	T33	0	2018	6	25	09:50	F	Ad		875	73	73	31,74	3,90	1,75	13	2,0	80	4	1	8,7
34	620098100206100	T39	0	2018	6	26	08:55	M	Ad	141,14ev	1150	77	71	38,17	6,71	1,75	12	3,0	81	3	1	11,7
36	620098100212980	T24	0	2018	6	26	10:05	M	Ad		1025	72	75	35,95	3,99	7,25	46	2,0	22	9	2	9,1
38	620098100207038	T37	1	2018	6	27	08:40	F	Ad		1125	81	82	25,63	3,80	3,50	55	15,0	21	2	7	7,1
39	620098100206952	T35	0	2018	6	27	09:15	F	Ad		1050	68	74	35,25	4,37	8,50	40	4,0	51	4	1	11,0
42	620098100207148	T24	0	2018	7	12	01:40	M	Ad		1150	81	81	46,15	6,53	8,50	37	3,0	55	3	2	13,6
46	620098100208481	T37	0	2018	7	12	10:00	M	Juv	81,2abr	614	67	63		5,64	5,25	52	1,0	42	4	1	9,8
47	620098100204676	T14	0	2018	7	12	10:45	F	Ad		930	73	70	32,50	5,05	3,00	70	4,0	21	1	1	9,4
48	620098100206084	T11	0	2018	7	12	23:30	F	Ad		1007	80	72		5,17	4,00	28	0,0	65	4	3	10,4
49	620098100212493	T22	0	2018	7	13	00:30	M	Juv	59,1mar	465	65	63	30,63	4,18	4,25	17	16,0	52	9	6	7,7
51	620098100206018	T11	1	2018	7	13	08:48	F	Ad		980	73	73	34,18	5,51	4,25	20	5,0	63	10	2	9,0
54	620098100206938	T35	1	2018	7	13	10:15	F	Ad		1003	78	75	37,84	5,74	2,50	49	1,0	43	5	4	10,1
56	620098100196626	T25	0	2018	7	14	00:20	F	Ad		1107	77	78	41,67	6,68	8,00	21	1,0	73	4	1	13,3
61	620098100206239	T13	0	2018	7	15	09:57	M	Juv	79,2abr	601	69	65	29,41	5,96	6,25	41	8,0	48	2	1	9,3
66	620098100206897	T11	0	2018	7	15	09:45	M	Ad		1168	77	77	66,30	6,83	5,25	45	11,0	38	5	1	13,1
68	620098100209179	T16	0	2018	7	15	10:25	F	Ad	112,2mar	771	74	71		6,74	5,50	39	0,0	52	6	3	14,6
72	620098100212561	T16	1	2018	7	16	09:08	M	Ad		1185	72	78	30,24	7,97	18,00	59	11,0	29	0	1	11,1
74	620098100202268	T28	1	2018	8	17	00:49	F	Ad		1025	74	76		7,89	8,25	42	1,0	43	10	4	10,9
76	620098100213834	T26	1	2018	8	17	09:04	M	Ad		1005	79	76	28,45	8,69	12,75	13	9,0	82	2	0	8,2
79	620098100212067	T30	0	2018	8	17	10:26	F	Ad		1047	78	77	45,36	7,13	6,50	14	2,0	83	8	0	11,4
80	620098100212176	T24	0	2018	8	17	11:15	M	Ad		1048	77	77	34,88	4,99	4,25	21	2,0	71	6	0	9,7
82	620098100208412	T50	1	2018	8	17	12:59	M	Ad		1238	78	78	38,26	5,82	3,00	18	7,0	68	7	0	9,6
83	620098100207593	T10	0	2018	8	17	13:13	F	Ad		1147	90	76	22,62	6,48	11,50	50	9,0	30	11	0	12,0
90	620098100208062	T20	1	2018	8	19	09:00	F	Ad		926	79	72	39,64	5,61	5,75	30	18,0	49	3	0	8,4
92	620098100206018	T12	1	2018	8	19	23:24	F	Ad		1014	74	75	30,08	6,82	10,00	30	4,0	67	12	0	10,8
95	620098100208913	T6	0	2018	8	19	09:00	F	Ad		1024	82	78	28,45	39,56		55	13,0	30	2	0	9,5
98	620098100208933	T14	1	2018	8	20	08:40	M	Ad		1225	76	75	37,38	4,64	5,50	55	1,0	38	8	0	11,5
99	620098100222347	T39	0	2018	8	20	09:48	F	Ad		1119	76	80	42,30	7,54	6,00	52	1,0	38	8	1	12,8
100	620098100222347	T24	1	2018	8	20	09:48	F	Ad		1084	76	77	34,70	4,75	7,60	17	4,0	73	5	1	10,6
110	620098100206018	T13	1	2018	9	7	09:38	F	Ad		1109	75	77		4,75	8,50	52	14,0	25	2	7	6,5
112	620098100206243	T38	1	2018	9	7	09:38	F	Ad		1109	75	77	33,10	5,04	7,75	52	14,0	25	2	7	6,5
113	620098100212516	T17	1	2018	10	29	00:40	F	Ad		1185	74	75	33,10	4,41	8,75	51	5,0	51	1	1	6,1
114	620098100216383	T23	0	2018	10	29	22:05	F	Ad		1122	74	70	28,90	2,28	1,25	54	3,0	31	2	1	5,1
116	620098100208062	T41	1	2018	10	31	22:10	F	Ad		1017	72	70	28,90	2,28	1,25	54	3,0	31	2	1	5,1
117	620098100212334	T34	1	2018	3	27	00:33	M	Ad		1063	73	77	33,10	6,39	8,00	35	3,0	44	11	1	11,0
120	620098100214354	T14	0	2019	7	27	08:54	M	Ad		1048	73	74	34,80	4,81	4,50	35	3,0	48	8	1	5,6
121	620098100216175	T16	0	2019	7	27	08:54	F	Ad		884	71	74	9,04	1,08	5,25	71	4,0	108	1	1	4,9
122	620098100209764	T23	0	2019	7	28	08:40	F	Juv		630	69	70	21,95	4,87	5,25	71	4,0	108	1	1	4,9
123	620098100212334	T24	1	2019	7	28	09:24	M	Ad		1289	77	78	21,91	2,39	5,00	78	7,0	77	1	1	4,9

Anexo 6 – Dados recolhidos dos coelhos-bravos capturados em folha Microsoft Office Excel – Análises Coprológicas. Continua na página seguinte.

ID capt	ID coelho	ID armaz	Recapt	Ano	Mês	DI	Hor	Sex	Idad	Age (dia)	Peso	Comp. tarsd	Comp. orelh	Estrognif	Oxuride	Trieburis li	Anoploce	Eimer	Vill	McMasi	Sedimentat	
0	520098100212726	T19	-0	2008	5	21		M	Ad		1200	70	75	pos							34	x
2	520098100207038	T26	0	2008	5	21	10:15	F	Ad		1150	80	75	pos								x
3	52009810022347	T16	0	2008	5	21	11:00	F	Ad		1150	78	83	pos								x
4	520098100206243	T19	0	2008	5	21	11:38	F	Juv	87 24hr	650	69	72	pos								x
5	520098100210720	T14	0	2008	5	21	12:20	M	Ad		1050	72	75	pos								x
6	520098100213834	T27	0	2008	5	22	23:55	F	Ad		1150	83	77	pos								x
7	520098100213834	T27	0	2008	5	22	00:35	M	Juv	62 24hr	500	64	62	pos								x
8	520098100213879	T16	0	2008	5	22	08:43	F	Ad		1150	71	73	pos								x
9	520098100208657	T20	1	2008	5	22	09:23	F	Ad		1250	79	77	pos								x
10	520098100208933	T21	0	2008	5	22	09:35	M	Ad		1250	78	74	pos								x
11	520098100212576	T33	0	2008	5	22	10:10	F	Ad		1250	78	74	pos								x
13	520098100218244	T1	0	2008	5	23	09:25	M	Juv	36 24hr	300	56	60	pos								x
14	520098100206859	T20	0	2008	5	23	23:14	F	Ad		1150	70	76	pos								x
15	520098100213351	T16	0	2008	5	24	08:45	M	Ad		1250	74	77	pos								x
16	520098100206243	T19	1	2008	5	25	00:00	M	Ad		1150	75	75	pos								x
18	520098100211033	T6	0	2008	6	23	08:50	F														x
19	520098100208412	T10	0	2008	6	23	09:45	M	Ad		1175	78	74	pos								x
20	520098100212986	T4	0	2008	6	24	00:10	M	Juv	53 1hr	425	61	67	pos								x
21	520098100208694	T19	0	2008	6	24	00:55	F	Ad		1050	77	77	pos								x
22	520098100207923	T23	0	2008	6	24	09:05	M	Ad		1225	82	78	pos								x
24	520098100206243	T39	1	2008	6	24	10:45	F	Ad		1125	80	80	pos								x
25	520098100212726	T20	1	2008	6	24	11:30	F	Ad		1175											x
26	520098100212986	T4	1	2008	6	24	23:45	M	Juv													x
27	520098100208657	T20	1	2008	6	25	00:00	F	Ad		1100	76	74	pos								x
28	520098100206018	T11	0	2008	6	25	08:45	F	Ad		950	74	74	pos								x
29	520098100206608	T33	0	2008	6	25	09:30	F	Ad	14 1hr	875	73	73	pos								x
30	520098100212726	T22	1	2008	6	25	10:20	F	Ad		1200											x
31	520098100206854	T9	1	2008	6	25	23:40	F	Ad		1000											x
33	520098100206608	T42	1	2008	6	26	08:40	F	Ad		1150	77	71	pos								x
34	520098100206100	T39	0	2008	6	26	08:55	M	Ad		1075	72	71	pos								x
35	520098100213579	T16	1	2008	6	26	09:30	F	Ad		1025	72	75	pos								x
36	520098100212980	T24	0	2008	6	26	10:05	F	Ad		1025	72	75	pos								x
37	520098100211473	T29	1	2008	6	26	10:45	F	Ad	113 1hr	775	74	71	pos								x
38	520098100207038	T37	1	2008	6	27	08:40	F	Ad		1125	81	82	pos								x
39	520098100208052	T35	0	2008	6	27	09:15	F	Ad		1050	68	74	pos								x
40	520098100206100	T36	1	2008	6	27	10:00	M	Ad		1125	75	73	pos								x
41	520098100206018	T45	1	2008	7	12	00:45	F	Ad		988	81	75	pos								x
42	520098100207148	T24	0	2008	7	12	01:40	M	Ad		1150	81	72	pos								x
43	520098100208100	T17	1	2008	7	12	02:00	M	Ad		1122	74	72	pos								x
44	520098100206018	T3	1	2008	7	12	09:25	F	Ad		985	73	72	pos								x
45	520098100208052	T24	1	2008	7	12	09:40	F	Ad		977	73	72	pos								x
46	520098100206481	T37	0	2008	7	12	10:00	M	Juv	81 24hr	614	67	63	pos								x
47	520098100204676	T14	0	2008	7	12	10:45	F	Ad		930	70	70	pos								x
49	520098100212493	T22	0	2008	7	13	00:30	M	Juv	58 1hr	485	65	63	pos								x
50	520098100206243	T40	1	2008	7	13	10:57	M	Ad		1135	76	75	pos								x
51	520098100206018	T11	1	2008	7	13	08:48	F	Ad		980	73	75	pos								x
52	520098100209385	T4	1	2008	7	13	09:20	M	Juv	68 1hr	533	65	74	pos								x
53	520098100211091	T33	1	2008	7	13	09:55	F	Juv	81 24hr	615	70	63	pos								x
54	520098100208938	T35	1	2008	7	13	10:15	F	Ad		1003	78	75	pos								x
55	520098100208938	T29	1	2008	7	13	23:50	F	Ad		980	78	76	pos								x
56	520098100196526	T25	0	2008	7	14	00:20	F	Ad		107	77	78	pos								x
59	520098100208938	T17	1	2008	7	14	09:19	F	Ad		948	79	77	pos								x
63	520098100196526	T34	1	2008	7	15	08:47	F	Ad		1001	76	73	pos								x
64	520098100196526	T34	1	2008	7	15	09:21	F	Ad		1001	76	73	pos								x
65	520098100212980	T37	1	2008	7	15	09:30	F	Ad		1158	77	83	pos								x
66	520098100208937	T11	0	2008	7	15	09:45	M	Ad		1158	77	83	pos								x
67	520098100208935	T45	1	2008	7	15	10:13	M	Juv		771	74	71	pos								x
68	520098100209179	T16	0	2008	7	15	10:25	F	Ad		771	74	71	pos								x
69	520098100208229	T29	1	2008	7	15	23:31	M	Juv		771	74	71	pos								x

(Continuação)

71	620098100206018	T45	1	2018	7	16	09.05	F	Ad		1016	72	78	100	100	*	2.1	*
72	620098100213351	T16	1	2018	7	16	09.08	M	Ad		1185					*	2.2	*
73	620098100220191	T37	-1	2018	7	17	09.45	F	Juv	119 2+mar	800	78	80	pos	1550	*		*
75	620098100212576	T44	1	2018	8	17	01.46	F	Ad		1276					*	0.9	*
76	620098100213834	T26	1	2018	8	17	09.04	M	Ad		1005	79	76	pos	350	*	1.9	*
77	620098100205938	T20	1	2018	8	17	09.43	F	Ad		1021	80	75	50	200	*	2.5	*
78	620098100205329	T22	1	2018	8	17	10.05	M	Ad	118 2+abr	794	78	71			*	1.4	*
79	620098100212067	T30	0	2018	8	17	10.26	F	Ad		1047	78	77	pos		*	0.3	*
80	620098100212176	T24	0	2018	8	17	11.15	M	Ad		1048	77	77			*	1.5	*
81	620098100206243	T9	1	2018	8	17	12.00	M	Ad		1184	70	76	pos	150	*	1.4	*
82	620098100209412	T50	1	2018	8	17	12.39	M	Ad		1238	78	78			*	1.1	*
83	620098100207933	T10	0	2018	8	17	13.13	F	Ad		1147	80	76			*	0.6	*
84	620098100206018	T10	1	2018	8	17	23.55	F	Ad		1032	78	76			*	1.4	*
85	620098100204676	T30	1	2018	8	18	00.20	F	Ad		949	71	64			*	0.4	*
87	620098100212930	T34	1	2018	8	18	09.14	F	Ad		979	75	76	50		*	2.2	*
88	620098100205329	T12	1	2018	8	18	09.45	M	Ad	107 1+ma	750					*	1.3	*
89	620098100201915	T53	0	2018	8	18	23.50	F	Ad		1074	79	77	pos	100	*	1.9	*
90	620098100208052	T20	1	2018	8	19		F	Ad		926	79	72			*	0.7	*
92	620098100206018	T2	1	2018	8	19	09.00	F	Ad		1014	74	75	pos	50	*	1.7	*
93	620098100206530	T51	0	2018	8	19	09.56	M	Ad		1174	76	79	350		*	1.5	*
95	620098100208013	T6	0	2018	8	19	23.24	F	Ad		1024	73	78			*	1.9	*
98	620098100208933	T44	1	2018	8	20	08.40	M	Ad		1225	82	78			*	0.7	*
99	620098100212515	T39	0	2018	8	20	09.14	F	Ad		1119	76	75			*	1.2	*
100	620098100222347	T24	1	2018	8	20	09.48	F	Ad		1084	76	80	300		*	1.7	*
101	620098100207148	T16	1	2018	8	20	10.17	F	Ad		1055	79	77	pos	200	*	1.3	*
102	620098100205329	T22	1	2018	8	20	10.40	M	Ad		1184	74	77	pos	600	*	1.6	*
104	620098100212334	T26	0	2018	8	21	00.05	M	Ad		1057	77	79	50		*	1.5	*
105	620098100206018	T25	1	2018	8	21	09.16	F	Ad		991	76	77	pos	300	*	1.5	*
106	620098100196526	T16	1	2018	9	5	23.50	F	Ad		1090	71	77	pos	100	*	1.6	*
107	620098100209179	T16	1	2018	9	7	09.00	F	Ad		1019	75	77	pos	50	*	2	*
109	620098100208013	T29	1	2018	9	7	09.38	F	Ad		1017	72	70	pos	1800	*	1.5	*
110	620098100206018	T3	1	2018	10	29	22.05	F	Ad		1215	77	73	pos	50	*	4.6	*
114	620098100216383	T23	0	2018	10	31	08.47	M	Ad		925	74	70	300		*	3.3	*
115	620098100212334	T26	1	2018	10	31	22.10	F	Ad		1043	77	77	pos	pos***	*	4.7	*
116	620098100208052	T41	1	2018	3	10	22.35	M	Ad		1140	80.5	80.4	pos	250	*	1.8	*
117	620098100212334	T34	-1	2019	1	30	08.00	F	Ad		666	69	66	pos	250	*	1.5	*
118	620098100212258	T22	1	2019	5	23	08.45	F	Juv	86 2+fev	884	71	74	pos		*	1.5	*
119	620098100215583	T16	0	2019	7	27	08.54	F	Ad		894	69	70			*	1.6	*
121	620098100218175	T23	0	2019	7	28	08.40	F	Juv		1269	77	78	pos		*	1.3	*
122	620098100209764	T24	1	2019	7	28	09.24	M	Ad							*		*
123	620098100212334	T24	1	2019	7	28	09.24	M	Ad							*		*