

Mixomatose: uma ameaça para a lebre-ibérica?

Vários casos de mixomatose em lebres-ibéricas provenientes do sul do país foram recentemente confirmados no Laboratório Nacional de Referência de Saúde Animal (INIAV, I.P.), no âmbito do projeto +Coelho. A elevada positividade em lebres encontradas mortas e em animais caçados levanta preocupações justificáveis face à potencial ameaça que esta doença pode constituir à conservação da lebre-ibérica.

Margarida Dias Duarte, Carina Carvalho,
Fábio Abade dos Santos, Mónica V. Cunha,
Nuno Canada . INIAV, I.P.



Rita Amador, Patrícia Tavares Santos, Yolanda Vaz
Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV)



Ana Hora, Gonçalo Lopes . Instituto de Conservação
da Natureza e Florestas (ICNF)



Joana Abrantes, Ana Margarida Lopes, Pedro José
Esteves, Nuno Santos e Paulo Célio Alves . Centro
de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos
(CIBIO), da Universidade do Porto (CIBIO-InBIO)



João Carvalho, António Paula Soares . Associação
Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e
Biodiversidade (ANPC)



Fernando Castanheira-Pinto . Confederação Nacional
dos Caçadores Portugueses (CNCP)



Jacinto Amaro . Federação Portuguesa de Caça
(FENCAÇA)



O vírus da mixomatose é originário da América do Sul

O vírus da mixomatose é originário do continente americano. Quando infetadas, as espécies de leporídeos do género *Sylvilagus*, autóctones do sul e norte do continente americano, desenvolvem infeções subclínicas, ou acompanhadas de sinais ligeiros, geralmente recuperando totalmente da infeção. Estas espécies são, por isso, consideradas *hospedeiro reservatório* do vírus da mixomatose (Fenner e Ratcliffe, 1965).

A mixomatose é considerada uma doença de coelhos

A doença, designada “mixomatose” por induzir à formação de nódulos cutâneos que lembram tumores (mixomas), só foi reconhecida no final do século XIX, depois da introdução do coelho doméstico europeu (*Oryctolagus cuniculus*) na América do Sul. Uma vez infetado, o coelho-europeu desenvolveu doença sistémica grave, com mortalidade próxima de 100%, o que conduziu à identificação subsequente do agente (Fenner e Ratcliffe, 1965).

O vírus dispersa-se muito rapidamente através de vetores de transmissão mecânica, como as pulgas e os mosquitos que, conjuntamente, asseguram a continuidade da transmissão no verão e no inverno (Blanco *et al.*, 1993).

O vírus do mixoma é geneticamente relacionado com o vírus do Fibroma de Shope, frequentemente utilizado como vacina heteró-

loga contra a mixomatose. Induz a formação de fibromas cutâneos, geralmente inofensivos, e que regredem naturalmente.

O vírus da mixomatose infeta apenas leporídeos, não sendo por isso uma ameaça para o Homem.

Utilização de estirpes virulentas do vírus da mixomatose para controlo biológico de sobrepopulações de coelho-bravo

Introduzido várias vezes na Austrália para fins cinegéticos, o coelho rapidamente se tornou uma praga neste país, dadas as condições favoráveis de *habitat* e alimento e a ausência de predadores naturais. A sobrepopulação de coelhos-bravos comprometeu gravemente espécies nativas, afetando também a agricultura. Em 1950, para salvar a preservar as espécies autóctones, o governo australiano consentiu na libertação de uma estirpe altamente virulenta de vírus da mixomatose (SLS) para o controlo biológico das populações de coelho-bravo, que resultou na redução imediata do tamanho destas populações (Ratcliffe *et al.*, 1952).

No entanto, poucos anos depois, surgiam estirpes de vírus da mixomatose mais atenuadas e as populações de coelhos recuperaram progressivamente, tornando-se de novo uma praga. A coevolução do vírus da mixomatose com o coelho-bravo na Austrália constitui um exemplo clássico de coevolução entre um agente patogénico e um hos-

ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS DA MIXOMATOSE

O vírus da mixomatose, um *Leporipoxvirus* pertencente à Família *Poxviridae*, é um vírus de ADN de cadeia dupla e estrutura em forma de tijolo. Os viriões medem cerca de 200 nm e 300 nm respetivamente na sua menor e maior dimensão. Ao contrá-

rio de outros vírus de ADN, a replicação dos poxvírus ocorre exclusivamente no citoplasma das células infetadas, permitindo, por vezes, a visualização de corpos de inclusão ao microscópio ótico (Murphy *et al.*, 1995).

pedreiro (Kerr *et al.*, 2012).

Em 1952, uma outra estirpe de vírus da mixomatose (Lausanne) foi libertada clandestinamente em França, para controlo populacional. A partir dessa libertação, o vírus espalhou-se rapidamente para outros países europeus, incluindo o Reino Unido e Portugal e Espanha, onde se verificou uma redução drástica do tamanho da população de coelho-bravo (90-99%) (Ferreira e Alves, 2006; Ferreira e Delibes-Mateus, 2010). A coevolução entre o vírus da mixomatose e as populações naturais de coelho-bravo ocorreu também na Europa, incluindo Portugal, tendo originado uma diminuição da virulência das estirpes (Kerr *et al.*, 2012).

A mixomatose em lebres foi registada esporadicamente no passado

Considerada uma doença de coelhos, desde a sua introdução deliberada em França, a mixomatose foi apenas esporadicamente relatada em lebre, nomeadamente em lebre-europeia (*Lepus europaeus*) e em lebre-ibérica (*Lepus granatensis*).

A lebre, sendo também um leporídeo, pertence a um género taxonómico (*Lepus*), distinto do coelho-europeu (*Oryctolagus*).

Os casos esporádicos de mixomatose em lebres, documentados desde 1953, ocorreram em França (Jacotot *et al.*, 1954), Inglaterra (Barlow *et al.*, 2014), Irlanda (Collins, 1955) e Espanha (Lucas *et al.*, 1953), afetando apenas um único animal por episódio, alguns sem lesões de mixomatose. Inoculações experimentais de lebre-europeia sugeriram que esta espécie teria alguma resistência natural à infeção pelo vírus da mixomatose (Bull e Dickinson, 1937). A raridade destes eventos no passado sugeria baixa eficácia na transmissão do vírus coelho-a-lebre e lebre-a-lebre.

É curioso constatar que, também, alguns caçadores portugueses referem, no decurso da sua longa atividade cinegética, ter avistado esporadicamente uma ou outra lebre com sinais compatíveis com mixomatose. Estes potenciais casos não foram, contudo, testados em laboratório.

A partir de meados de 2018, verifica-se registo de mortalidade anormal em lebres no Reino Unido e na Península Ibérica

Não obstante o relato de casos de mixomatose em lebre no passado, a ocorrência de doença nesta espécie foi extremamente esporádica. Esta situação alterou-se profundamente no verão de 2018.

Em agosto, foi verificada mortalidade em lebre-ibérica em várias províncias do sul e centro de Espanha e, nos meses seguintes, registou-se mortalidade em lebre-europeia no leste da Inglaterra. Em ambos os países, foram encontrados vários animais mortos na mesma área, sugerindo causa de mortalidade de origem infecciosa e a possibilidade de transmissão direta entre lebres do agente patogénico envolvido. A suspeita de mixomatose foi colocada posteriormente, face aos sinais clínicos presentes em algumas lebres, muito semelhantes aos observados em coelhos infetados pelo vírus da mixomatose, como, por exemplo, cegueira, desorientação, conjuntivite e edema dos olhos, focinho, região anal e genitais. Foram publicados vários artigos de divulgação, refletindo a preocupação generalizada sobre a preservação destas espécies silvestres. Por exames laboratoriais, em novembro de 2018 foi confirmada a presença de mixomatose em lebre-ibérica em Portugal.

Decorre em Portugal um Plano de Vigilância Sanitária dos Leporídeos Silvestres (Projeto +Coelho)

Desde agosto de 2017 que decorre em Portugal o Projeto +Coelho, que executa o Plano de Ação para o Controlo da Doença Hemorrágica dos Coelhos, deliberado pelo Despacho 4757/2017, de 31 de maio do MAFDR e que envolve várias instituições da Administração Pública (INIAV, que coordena o plano, DGAV e ICNF) e entidades privadas (iBET, CIBIO-InBIO, OMV), bem como as organizações do setor de caça de 1.º nível (ANPC, CNCP e FENCAÇA).

Entre outras medidas, o Projeto inclui um programa de vigilância sanitária de leporídeos selvagens (coelho-bravo e lebre-ibérica), conduzido à escala nacional, com enfoque na doença hemorrágica viral. No entanto, a monitorização efetuada nos Laboratórios de Referência de Saúde Animal do INIAV (Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Produção e Saúde Animal - Oeiras) incide também sobre a mixomatose, que, conjuntamente com a doença

hemorrágica viral, constitui um dos fatores principais de mortalidade de origem infecciosa do coelho-bravo.

Este projeto conta, ainda, com a colaboração dos gestores e caçadores para a recolha de amostras biológicas no ato venatório em animais caçados, assim como da sociedade civil em geral, para a recolha e envio de cadáveres encontrados no campo, dentro e fora das zonas de caça. A contínua e atenta vigilância sanitária da fauna silvestre é fundamental para uma gestão sustentável dos recursos naturais.

As atividades do Projeto +Coelho são divulgadas no *site* do INIAV (<http://www.inia.pt/doenca-hemorragica-viral-dos-coelhos>), onde se disponibiliza também toda a informação necessária para a colheita e envio de amostras (Folhas de registo, Protocolos de colheita, Pontos de entrega de cadáveres e material biológico, etc.) e se partilham notícias e alertas sanitários.

Os dados da vigilância sanitária nas épocas venatórias 2017/2018 e 2018/2019 revelam que, desde novembro de 2018, a lebre-ibérica está a ser gravemente afetada pelo vírus da mixomatose em Portugal

No âmbito do Projeto +Coelho, durante a época venatória 2017/2018, foram analisados cerca de 80 exemplares de lebre-ibérica caçados no Alentejo e Algarve. Todos foram negativos a mixomatose. Entre agosto de 2017 e agosto de 2018, apenas foi rececionada uma lebre encontrada morta no campo, também esta negativa a mixomatose.

A amostragem de cadáveres desta espécie aumentou substancialmente desde setembro de 2018 até à presente data, com a análise de 12 espécimes encontrados mortos no campo. Destes, nove (75%) foram positivos a mixomatose, tendo o primeiro caso sido detetado no início de novembro, num animal caçado a 28 de outubro no município de Évora. Por se tratar de uma doença de declaração obrigatória, este primeiro caso, assim como o segundo registado no concelho de Beja, foi reportado à Organização Mundial

O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA MIXOMATOSE

Embora, quando presentes, os sinais clínicos da forma nodular de mixomatose (formações cutâneas e edemas) sejam indicativos da doença, a forma pulmonar pode passar despercebida, tal como a forma nodular nos estádios iniciais da infeção. É importante, por isso, proceder-se à confirmação do diagnóstico através da realização de exames laboratoriais. O diagnóstico do vírus da mixomatose é atualmente feito no INIAV por metodologias de moleculares, altamente sensíveis e específicas desenvolvidas pelo Laboratório de Virologia (Duarte *et al.*, 2014).



Figura 1 – O primeiro espécimen de lebre-ibérica positiva a mixomatose apresentava lesões compatíveis com a doença. A – edema das pálpebras e conjuntivite purulenta bilaterais; B – nódulos no focinho; C – edema da região perineal (Sala de Necrópsia, do Laboratório de Patologia da UEISPSA, INIAV)

MEDIDAS ESPECÍFICAS RECOMENDADAS PARA REDUÇÃO DA DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS EM LEPORÍDEOS

Enquanto são desenvolvidos esforços para o esclarecimento dos eventos de mortalidade anormal que se vêm verificando na lebre-ibérica, recomenda-se a aplicação de um conjunto de medidas, de índole prática, de forma a minimizar o impacto desta doença nas populações de leporídeos. Estas medidas foram já anteriormente publicadas pela DGAV ou pelo Grupo +Coelho, na forma de alertas e recomendações:

- Deve ser intensificada a vigilância ativa nas zonas de caça através da prospeção e recolha de cadáveres no campo, cumprindo os procedimentos de higiene e biossegurança recomendados;
- Sempre que se verifique mortalidade de lebres, não deve ser feita qualquer movimentação de animais (capturas, translocações, repovoamentos), mesmo que aparentemente saudáveis, por forma a evitar uma possível disseminação do(s) agente responsável(eis) por doença em lebres;
- As pessoas que não queiram manipular os cadáveres devem fotografá-los e registar a sua localização (de preferência coordenadas geográficas), enviando essa informação para a equipa do +Coelho (maiscoelho@iniav.pt; 214403500) e avisando o Gestor da Zona de Caça mais próxima da presença desse animal;
- Estes animais encontrados mortos não devem ser consumidos em quaisquer circunstâncias;
- Deve ser reportada ao Grupo de Trabalho +Coelho a presença de lebres doentes ou mortas (maiscoelho@iniav.pt; 214403500);
- Os animais vivos com sinais de doença devem ser capturados, co-

- locados dentro de uma caixa (de preferência, caixa de plástico com arejamento, para que possa ser convenientemente limpa e desinfetada), com vista ao seu envio rápido para os Laboratórios Nacionais de Referência de Saúde Animal, no INIAV (o INIAV deve ser imediatamente contactado telefonicamente - 214403500);
- Os cadáveres deverão ser recolhidos para análise, seguindo procedimentos de higiene e biossegurança, de acordo com a metodologia disponibilizada no *site* do INIAV (http://www.iniaiv.pt/fotos/editor2/protocolo_colheita.pdf e <http://www.iniaiv.pt/gca/?id=1822>);
- Caso não disponha de *kits* de recolha, o cadáver deve ser colocado dentro de um saco de plástico e esse colocado dentro de outro, utilizando sempre luvas descartáveis (luvas de cozinha ou outras, ou ainda sacos de plástico protegendo as mãos, que depois devem ser colocados dentro do segundo saco para eliminação); manter o cadáver refrigerado se o envio for imediato. Caso contrário, congelá-lo;
- Sempre que os cadáveres não sejam enviados para análise, devem ser corretamente eliminados por enterramento em vala, previamente revestida com cal em pó ou hidratada, que também deve ser aplicada sobre os cadáveres, antes de serem cobertos por uma camada de terra com altura mínima de um metro [subalínea v) da alínea a) do artigo 8.º do Reg. CE n.º 1069/2009] ou através de encaminhamento para empresa de tratamento de subprodutos;
- Deve evitar-se o contacto dos animais suspeitos com cursos de água naturais ou pontos de abeberamento.

de Saúde Animal (OIE), em 04.II.2018, pela autoridade veterinária nacional (DGAV).

Foram também analisadas 31 lebres caçadas, algumas com sinais de doença. Destas, nove foram positivas a mixomatose (29%).

A prevalência do vírus da mixomatose em coelhos-bravos caçados nas épocas venatórias 2017/2018 e 2018/2019 foi, respetivamente, de 4,95% e 3,65% (embora ainda estejam a decorrer análises nas amostras provenientes da última época de caça). Nos coelhos-bravos encontrados mortos, a percentagem de amostras positivas, recolhidas entre setembro de 2018 e janeiro de 2019, foi de 27,27%, significativamente superior ao valor detetado na amostragem recolhida entre agosto de 2017 e agosto de 2018 (7,69%). Estes dados podem refletir um aumento da patogenicidade das estirpes mais recentes de vírus do mixoma ou uma maior circulação do vírus nas populações de coelho-bravo. De facto, alguns gestores de zonas de caça do sul do país reportaram à equipa do Projeto +Coelho elevada mortalidade de coelho-bravo evidenciando lesões sugestivas de mixomatose, embora estes casos não tenham sido confirmados laboratorialmente, uma vez que os cadáveres não foram enviados para análise.

Em 2018, os testemunhos dos gestores e caçadores reportando lebres com sinais de mixomatose aumentaram substancialmente, alguns acompanhados pelo envio de registos fotográficos dos animais doentes. Esta tendência de avistamentos continua.

A causa da mortalidade em lebres não está, ainda, totalmente esclarecida

Não obstante os Laboratórios Nacionais de Referência de Espanha (Laboratório Central de Veterinária de Algete, Madrid) e de Portugal (UEISPSA, INIAV, Oeiras) tenham demonstrado a presença de vírus da mixomatose nos tecidos de lebres encontradas mortas e lebres caçadas, não se pode ainda excluir que outros agentes patogénicos possam também estar envolvidos na mortalidade alarmante e súbita de lebre-ibérica que se verificou nos dois países. Eventuais coinfeções podem resultar na diminuição da condição imunológica dos animais, propiciando o desenvolvimento de formas clínicas de mixomatose. No entanto, não foram detetadas lebres positivas a mixomatose na época venatória anterior (2017/2018), o que sugere que o vírus não estaria a circular nesta espécie de forma assintomática.

É também possível que, à semelhança do que ocorreu no final do século XIX, quando da

transmissão do vírus da mixomatose dos seus hospedeiros naturais (*Sylvilagus*) para os coelhos-europeus (*Oryctolagus*), que resultou no aumento acentuado da virulência num novo hospedeiro, tenha ocorrido uma nova transmissão entre espécies, agora entre *Oryctolagus* e *Lepus*. A aquisição da capacidade deste vírus infetar lebres de forma

eficiente pode ter resultado de alterações genéticas nas estirpes anteriormente em circulação, que, porventura, aumentaram o grau de suscetibilidade da lebre à doença, ou mesmo a virulência, para os leporídeos em geral. As diferenças genéticas entre as estirpes virais que estiveram envolvidas nos casos esporádicos observados desde a

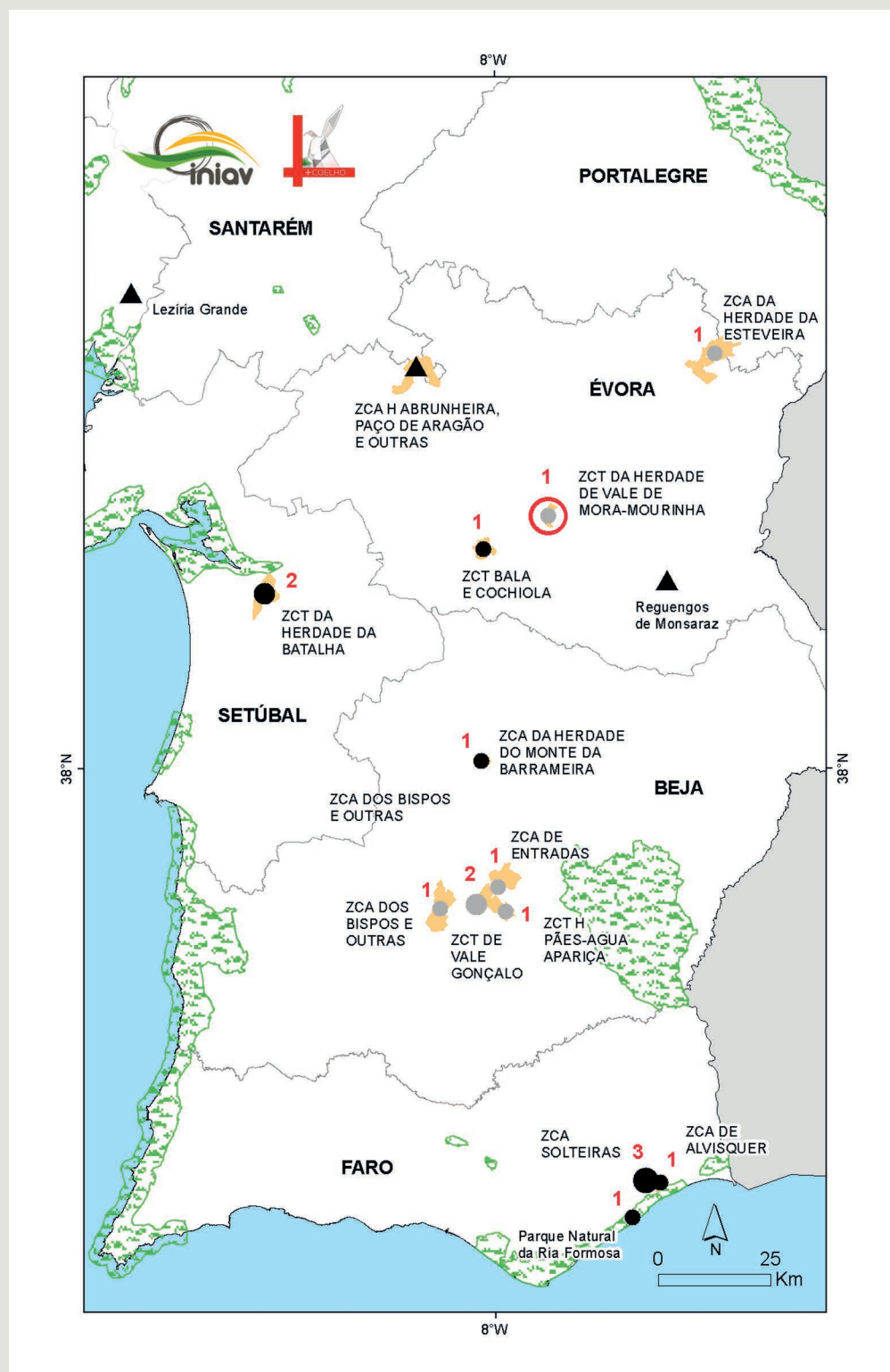


Figura 2 – Localização dos casos positivos de mixomatose em lebre-ibérica, identificados no âmbito do Projeto +Coelho. Os círculos pretos representam a localização dos cadáveres encontrados no campo, os círculos cinzentos dos animais caçados e os triângulos evidenciam a localização dos animais avistados com sinais compatíveis com mixomatose. O anel vermelho assinala a localização do primeiro caso diagnosticado em Portugal. A beje representam-se as zonas de caça (Mapa construído em ArcGIS por João Fernandes, INIAV)



Figura 3 – Lebres-ibéricas com sinais compatíveis com mixomatose fotografadas na Companhia das Lezírias a 01.12.2018 (esquerda) e a 26.01.2019 (direita), por Daniel Raposo e Joaquim Brunheta, a quem a equipa do Projeto +Coelho agradece a colaboração

década de 50 e as que estão na origem dos múltiplos casos verificados recentemente (2018) estão ainda por esclarecer.

Na Europa, as estirpes mais atenuadas que sucederam às que circularam na década de 50 originam mortalidades mais baixas, frequentemente não conduzindo, por si só, à morte dos animais, embora favoreçam a exposição à predação pela debilidade que causam.

Considerações finais

Os recentes eventos de mortalidade registados em lebre-europeia e em lebre-ibérica, surpreenderam e alarmaram os agentes no terreno e a comunidade científica, preocupando todos os que zelam pela biodiversidade. Algumas das questões levantadas por estes acontecimentos foram já mencionadas, como a eventualidade de haver outros agentes patogénicos envolvidos nesta mortalidade anormal. Interessa esclarecer se os casos verificados no Reino Unido e na Península Ibérica estão epidemiologicamente ligados, se o vírus que atualmente infeta as lebres e os coelhos é o mesmo, e se, quando isolado das lebres, o vírus da mixomatose é infeccioso para o coelho.

A identificação da eventual alteração genómica que permitiu ao vírus adquirir a capacidade de infetar a lebre, a eventual existência de outra espécie hospedeira, as formas de expansão geográfica utilizadas por este vírus (populações de leporídeos ou ação antropogénica) e o rumo da evolução da sua virulência para a lebre e para o coelho-bravo, são aspetos que interessa esclarecer e compreender.

A execução do projeto +Coelho tem permitido conhecer e divulgar de forma regular, informação atualizada sobre a distribuição,

incidência e evolução da mixomatose e da doença hemorrágica viral no território nacional. A disseminação da informação e do conhecimento gerado pelo projeto aos agentes do terreno e à comunidade em geral, neste, e em outros domínios dos seus eixos de intervenção (Programa de Investigação, Boas Práticas de Gestão e Medidas de Controlo Sanitário), é essencial e prioritária. Esta partilha só tem sido possível através do esforço coletivo dos seus parceiros e de todos os que têm apoiado as iniciativas e atividades que o Grupo de Trabalho vem desenvolvendo desde 2017. 📷



Projeto "+COELHO: Avaliação Ecosanitária das Populações Naturais de Coelho-Bravo Visando o Controlo da Doença Hemorrágica Viral" financiado pelo FUNDO FLORESTAL PERMANENTE.

Bibliografia

- Barlow, A. *et al.* (2014). *Vet Rec.*, **175**(3):75-76.
- Blanco, J.C.; Villafuerte, R.C. (1993). Empresa de Transformación Agrária, S.A. 122 pp.
- Bull, L.B.; Dickinson, C.G. (1937). *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*, **10**:291-294.
- Collins, J.J. (1955). *Irish Veterinary Journal*, **9**:268.
- Duarte, M.D. *et al.* (2014). *J. Virol. Methods*, **196**:219-224.
- Fenner, F.; Ratcliffe, F.N. (1965). Cambridge University Press, Cambridge, 379 pp.
- Ferreira, C.; Alves, P.C. (2006). Federação Alentejana de Caçadores, Beja.188 pp.
- Ferreira, C.; Delibes-Mateos, M. (2010). *Wildl. Biol. Pract.*, **6**.
- Jacotot, H. *et al.* (1954). *Annales de l'Institut Pasteur*, **86**:105-107.
- Kerr, P.J. *et al.* (2012). *PLoS Pathog.*, **8**.
- Lucas, A. *et al.* (1953). *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, **39**:770-776.
- Monterroso, P. *et al.* (2016). CIBIO/InBIO, ICNF & Câmara Municipal de Mértola.
- Murphy, F.A. *et al.* (1995). *Archives of Virology, Supplement 10*, Springer Verlag, Vienna, 586 pp.
- Ratcliffe, F.N. *et al.* (1952). *Nature*, **170**:7-19.