



GOVERNO DE
PORTUGAL

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO MAR



"PROMOÇÃO DO HABITAT DO LINCE-IBÉRICO
E DO ABUTRE-PRETO NO SUDESTE DE PORTUGAL"

LIFE Habitat Lince Abutre

LIFE08 NAT/P/000227

Documento A7002

**Avaliação do estado sanitário das populações animais domésticas e selvagens
que podem partilhar doenças e habitat com o lince ibérico**

Relatório final

Agosto 2014

Direção Geral de Alimentação e Veterinária

Índice

1	Agradecimentos	3
2	Introdução	4
3	Exposição introdutória e metodologias.....	5
3.1	Amostragem	5
3.2	Análise dos dados.....	19
4	Resultados	20
4.1	Imunodeficiência felina (FIV)	20
4.2	Leucemia felina (FeLV).....	21
4.3	Panleucopénia felina e Parvovirose canina (PV)	22
4.4	Esgana (CDV)	24
4.5	Peritonite infecciosa felina e Coronavirose canina (CoV)	26
4.6	Calicivirose felina (FCV)	28
4.7	Doença de Aujeszky (ADV)	29
4.8	Tuberculose Bovina (<i>Mycobacterium bovis</i>)	31
4.9	Cytauzoonose (<i>Cytauzoon felis</i>)	34
4.10	Rinotraqueíte felina (FHV)	36
4.11	Leptospirose (<i>Leptospira interrogans</i>)	37
4.12	Brucelose (<i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. canis</i>)	39
4.13	Pasteurelose (<i>Pasteurella haemolytica</i>)	43
4.14	Clamidiose (<i>Chlamydomphila felis</i>).....	44
4.15	Tularémia (<i>Francisella tularensis</i>)	45
4.16	Coccidiose (Família <i>Eimeriidae</i>)	47
4.17	Toxoplasmose (<i>Toxoplasma gondii</i>)	49
4.18	Leishmaniose (<i>Leishmania infantum</i>)	50
4.19	Riquetsioses e Piroplasmoses (<i>Anaplasma sp.</i> , <i>Ehrlichia sp.</i> , <i>Babesia sp.</i> , <i>Theileria sp.</i>)	52
4.20	Paratuberculose (<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>)	53
5	Discussão	55
5.1	Considerações metodológicas	55
5.2	Grupos, doenças e possíveis impactos nas populações de lince	56
5.2.1	Agentes não detetados nas áreas em estudo	65
5.2.2	Agentes detetados nas áreas em estudo	71
6	Conclusões e perspectivas futuras	84
7	Lista de símbolos e abreviaturas	89
8	Índice de tabelas, mapas e figuras	91
9	Anexos	95

1 Agradecimentos

A Direção Geral de Alimentação e Veterinária agradece a todos os que colaboraram nesta ação do projeto LIFE Habitat Lince Abutre, desde a conceção do estudo epidemiológico até à elaboração do presente relatório, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho, e em particular:

- A todos os parceiros do projeto LIFE Habitat Lince Abutre, nomeadamente a Liga para a Proteção da Natureza, o Centro de Estudos da Avifauna Ibérica, a Associação Nacional de Proprietários Rurais, Gestão Cinegética e Biodiversidade, a Associação dos Jovens Agricultores de Moura, o Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas e o Centro de Investigação e de Intervenção Social;
- À Comissão Executiva do Plano de Ação para a Conservação do Lince Ibérico em Portugal e ao seu grupo técnico veterinário;
- Ao Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac;
- À Universidade de Évora;
- Ao Projeto LIFE *Inovação contra Envenenamentos* (LIFE09 NAT/ES/000533);
- Aos Médicos Veterinários Municipais das áreas de intervenção do projeto;
- À Pygargus, Serviços Veterinários, Lda.;
- À Comissão de Aconselhamento Técnico e Científico do projeto;
- Aos investigadores do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária;
- À Dr^a Susana Soares e ao Dr. Telmo Nunes.

2 Introdução

O lince ibérico, *Lynx pardinus*, é a espécie felina mais ameaçada do mundo e a única em perigo crítico na lista vermelha da International Union for the Conservation of Nature (IUCN), estando também classificada como Criticamente em Perigo (CR) pelo Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Inúmeros fatores, ao longo do século XX, conduziram a esta situação, provocando declínios populacionais e conduzindo subsequentemente a este estado de pré-extinção em Portugal. Destes salientam-se a destruição/fragmentação do habitat desta espécie, declínios nas populações da sua principal presa, o coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus*), e mortalidades não naturais e naturais. Estas últimas, deveras importantes, têm sido exacerbadas por estes *bottlenecks* demográficos, baixa variabilidade genética e pelo contacto cada vez mais frequente com espécies domésticas.

É neste contexto que se torna importante o estudo do estado sanitário das populações domésticas e selvagens que partilham doenças e habitat com o lince ibérico, não só porque a recolonização natural tem uma forte probabilidade de ocorrer nas áreas de intervenção do projeto, tendo em conta a proximidade com as populações reprodutoras de Espanha, mas também porque a reintrodução deste animal em Portugal está a ser planeada.

O presente relatório técnico de avaliação deste estado sanitário é o resultado do delineado no Protocolo de Estudo Epidemiológico (LIFE08 NAT/P/000227/A7001) e da sua consequente implementação e execução, constituindo a terceira fase da ação A.7 do Projeto LIFE08 NAT/P/000227.

No início deste relatório, é feita uma pequena exposição introdutória sobre as áreas, espécies e agentes patogénicos em análise, apresentando-se algumas considerações metodológicas e resultados da amostragem realizada assim como a metodologia usada para tratamento dos dados.

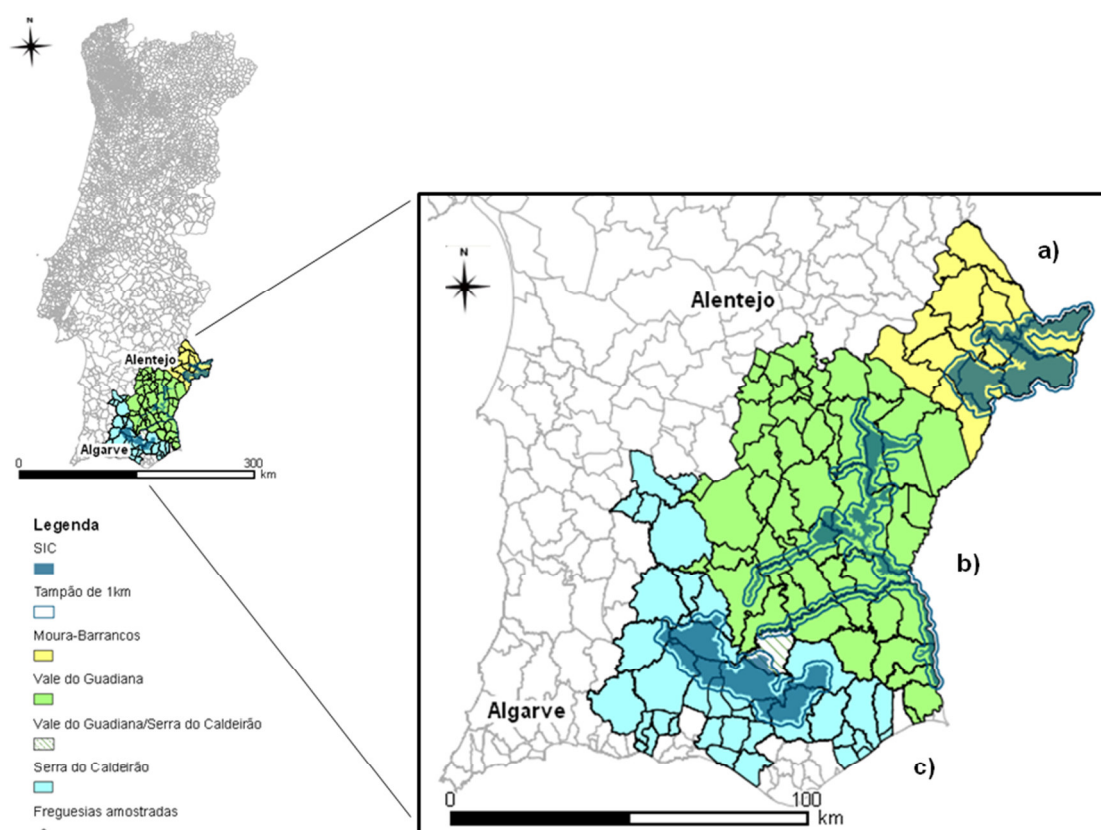
Em seguida, numa segunda parte, cada agente patogénico é tratado individualmente quanto aos resultados obtidos, discussão imediata dos mesmos e análise estatística efetuada.

Numa terceira parte, é realizada a discussão geral destes dados assim como a avaliação da pertinência de proceder posteriormente a uma análise de risco da reintrodução do lince ibérico em Portugal naquelas áreas.

3 Exposição introdutória e metodologias

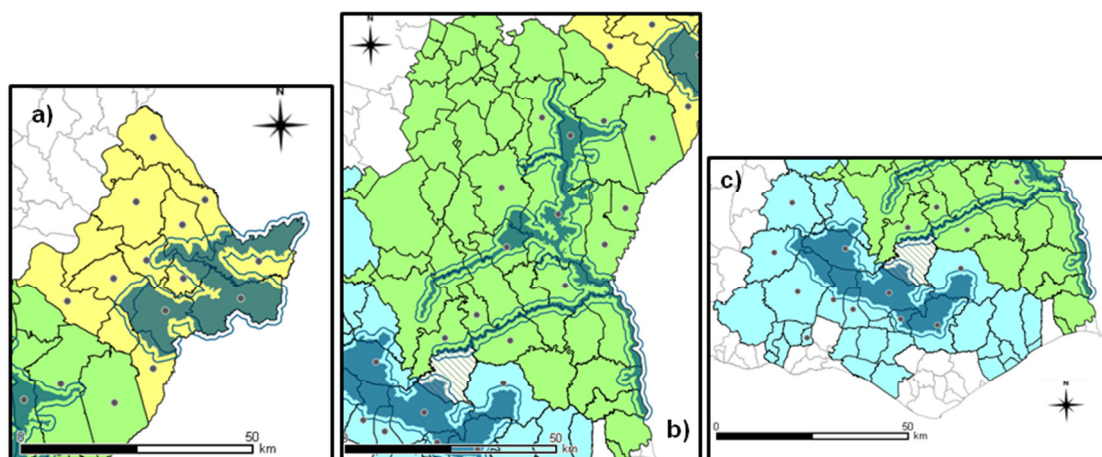
3.1 Amostragem

O estudo incidiu nas três zonas abrangidas pelo projeto: Moura-Barrancos, Vale do Guadiana e Serra do Caldeirão. Dada a mobilidade das espécies em estudo, as freguesias dos concelhos que fossem abrangidos por um tampão de 1 quilómetro destas zonas também foram consideradas áreas de interesse para amostragem. Adicionalmente, algumas freguesias fora dos limites estabelecidos, são aqui também consideradas uma vez que representam apenas os locais de amostragem de animais que se sabe fazerem uso das zonas abrangidas pelo projeto, como é exemplo as matilhas de caça (Mapa 1 e 2).



Mapa 1: Freguesias dos Concelhos abrangidos pelo Projeto ou limítrofes das 3 áreas em estudo

a) Moura-Barrancos; b) Vale do Guadiana; c) Serra do Caldeirão



Mapa 2: Detalhe das três áreas em estudo e freguesias amostradas incluindo as exteriores à zona tampão

a) Moura-Barrancos; b) Vale do Guadiana; c) Serra do Caldeirão

As populações alvo desta amostragem, por razões metodológicas e práticas, foram organizadas em função da sua suscetibilidade às doenças em estudo e do seu grau de prioridade em 6 grupos (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos em estudo

Nº	Grupo	Prioridade
1	Felídeos domésticos/ferais/selvagens	1
2	Canídeos domésticos/ferais/assilvestrados	1
3	Outros carnívoros selvagens	2
4	Ungulados domésticos e selvagens	2
5	Lagomorfos e roedores selvagens	3
6	Ixodídeos e Argasídeos	3

As doenças (agentes patogénicos) analisadas nos diferentes grupos populacionais são as que se encontram na Tabela 2, com as respetivas prioridades e impactos para o lince ibérico, definidos pelo grupo técnico veterinário, no âmbito da Comissão Executiva do Plano de Ação para a Conservação do lince ibérico em Portugal.

As doenças de prioridade 3 (baixa) não foram consideradas para este estudo, à exceção de alguns agentes infecciosos transmitidos por ixodídeos e argasídeos, cuja prevalência foi avaliada indiretamente, através da análise dos vetores (Grupo 6).

Tabela 2: Doenças, Prioridades, Impacto e Grupos em estudo

Doenças	Prioridade	Impacto	Grupos analisados
Imunodeficiência felina	1	A	1
Leucemia felina	1	A	1
Panleucopénia felina e Parvovirose canina	1 2	A A	1,2,3
Esgana	1	A	1,2,3
Peritonite infecciosa felina	1	A	1,2,3
Calicivirose felina	1	A	1
Doença de Aujeszky	1	A	4
Tuberculose	1	A	3,4
Cytauxzoonose	1	B	1
Rinotraqueíte felina	1	C	1

Leptospirose	2	B	1,2,3,4,5
Brucelose	2	B	2,3,4
Pasteurelose	2	C	3,4,5
Clamidiose	2	C	1
Tularémia	2	C	5
Coccidiose	2	C	3,5
Toxoplasmose	2	C	1,5
Leishmaniose	2	C	2,3
Anaplasmose	2	C	6
Ehrlichiose canina	2	C	6
Paratuberculose	2	N.d.	4
Bartonelose	3	C	6
Doença de Lyme	3	C	6
Babesiose	3	C	6
Theileriose	3	C	6

Continuação da Tabela 2

N.d. – Não determinado; Prioridade: 1-Alta, 2-Média, 3-Baixa; Impacto: A-agentes em que esteja documentado causarem mortalidade em linces, B-agentes que potencialmente podem causar mortalidade por comparação com outras espécies de felídeos não-domésticos, C-agentes que podem causar doença no lince.

Deste modo, a dimensão da amostra para cada grupo e para cada área em estudo foi calculada tendo por base prevalências esperadas variáveis em concordância com a afeção com maior prevalência em cada grupo (com base na bibliografia disponível) e estimativas das populações existentes em cada zona para cada grupo (determinadas no Protocolo do Estudo Epidemiológico). Nestes cálculos foi usado um intervalo de confiança de 95% e um erro de 10%.

As amostras foram posteriormente recolhidas dos animais incluídos no estudo por meio de combinações de processos de amostragem ativa¹ e passiva (Anexos I e II).

- Grupo 1 - Felídeos domésticos/ferais/selvagens
Amostras de sangue e zaragatoas fecais, conjuntivais, nasais e orofaríngeas de gatos domésticos localizados fora dos centros urbanos foram recolhidas, após consentimento dos proprietários, enquanto o mesmo tipo de amostras mas de gatos-bravos foi obtido por captura por armadilhagem com armadilhas de vários tipos: caixa de uma só entrada ou de dupla entrada, Tomahawk™ (Fig.1 e 2). As várias armadilhas foram colocadas de forma estratégica, em locais com evidências de utilização por carnívoros selvagens (por exemplo, trilhos, dejetos ou outras marcações) e relativamente abrigados de perturbações e de condições climáticas menos favoráveis (Fig.3). A colocação das armadilhas foi realizada tendo por base uma maximização do espaçamento entre elas de forma a permitir num tamanho de grelha a vistoria da totalidade num máximo de 3 horas ao início da manhã e ao final da tarde. Em situações em que se previa a ocorrência de condições ambientais particularmente desfavoráveis (temperaturas máximas acima dos 35°C ou precipitação superior aos 8

¹ Incluindo armadilhagem ao abrigo das licenças números 328, 362, 367, 395, 396, 397, 399, 400, 401 e 402/2011/CAPT/MANUS, para captura e manuseamento de exemplares da fauna selvagem no território de Portugal continental, de acordo com o disposto no Decreto-Lei nº140/99 de 24 de abril, com a nova redação dada pelo decreto-Lei nº49/2005 de 24 de fevereiro e do Decreto-Lei nº316/89, de 22 de setembro.

milímetros) as armadilhas foram desativadas para evitar a exposição dos animais capturados a estas condições adversas.

A manipulação dos animais capturados foi efetuada sempre no final da vistoria às armadilhas com o máximo de cuidado para minimizar o stress do animal. O animal capturado foi transferido para jaulas de contenção sendo de seguida pesado com uma balança (HCB20K10, Kern & Sohn GmbH) e, depois de calculado o peso, preparada a respetiva anestesia. Os animais foram anestesiados com uma combinação de quetamina (Imalgene®, 100 mg/ml, Merial Laboratórios, Portugal ou Clorketam®, 100mg/ml, Vétoquinol, Portugal) e medetomidina (Medetor®, 1 mg/ml, Virbac, Portugal ou Domitor®, 1mg/ml, Pfizer, Portugal) conforme o Protocolo de manipulação de carnívoros (Anexo I). A anestesia foi revertida com atipamezol (Revertor®, 5 mg/ml, Virbac, Portugal ou Antisedan®, 5mg/ml, Pfizer, Portugal). Os fármacos foram administrados nos músculos da coxa, com uma seringa de 1 ou 2 ml e uma agulha 23 G.

Após a administração anestésica, o animal foi deixado na jaula de contenção coberta a cerca de 100 metros dos operadores. Foi feita uma monitorização do plano anestésico à distância, a intervalos regulares. Os reflexos (palpebral, cutâneo e auricular) do animal foram verificados até à sua perda total ou quase total. Quando necessário efetuou-se a administração de nova dose anestésica. Nestes casos, administrou-se metade das doses previamente administradas, tanto de quetamina, como de medetomidina.

No momento da perda dos reflexos, o animal foi colocado numa mesa desmontável, previamente protegida com um resguardo descartável (Fig.4) e procedeu-se da seguinte forma:

- Aplicação de soro fisiológico nos globos oculares, para proteger a córnea da ressecção e colocação de uma pequena toalha escura sobre a cabeça do animal, para prevenir lesões na retina por exposição aos raios solares;
- Colocação da sonda lingual do pulsoxímetro (modelo VM 2160™, com sensor lingual Viamed, Viamed) para a monitorização contínua da frequência cardíaca e da saturação parcial de oxigénio;
- Introdução do termómetro digital de monitorização contínua (modelo DataTherm II™, Geratherm) no reto para a medição da temperatura rectal;
- Monitorização da frequência respiratória por observação dos movimentos respiratórios abdominais e com o auxílio de um cronómetro.

O sangue foi colhido da veia cefálica e/ou da veia safena, consoante o operador, as dimensões do animal e o calibre das veias. Foram utilizadas agulhas de 23 ou 21 G e seringas de 1, 2 ou 5 ml. Quando a quantidade de sangue colhido foi suficiente (mais de 1 ml), colocou-se num tubo com ativador de coagulação. As zaragatoas foram recolhidas de forma asséptica e colocadas em tubos simples. Todas as amostras foram imediatamente armazenadas numa geleira e protegidas da luz solar e da chuva. Posteriormente as amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 rotações por minuto durante 10 minutos numa centrifugadora portátil (CNT800D, Quirumed®)

e o soro, separado por pipetagem, foi recolhido num tubo simples. No decurso da recolha de amostras para este projeto: a idade do animal foi estimada com base no peso do animal e sua dentição (eventual presença de dentes decíduos e desgaste dos dentes definitivos), foi feito um exame de estado geral (avaliação das mucosas, linfonodos, palpação abdominal e eventuais lesões) e foram obtidas várias biometrias (comprimento total, da cauda e do tarso), ao que se seguiu a introdução de um *microchip* (Backhome™, Virbac Portugal Lda.) subcutâneo em posição anterior à escápula.

No final do procedimento, foi preparada a dose de atipamezol tendo em conta os reflexos e o estado de consciência do animal. Nos casos de recuperação súbita da anestesia, não foi administrada qualquer dose de atipamezol. O animal foi então colocado na jaula de contenção, coberta com uma toalha ou manta. Esta foi afastada cerca de 100-200 metros dos operadores e colocada em local abrigado. O animal foi vigiado a intervalos regulares até recuperação anestésica total ou quase total. A sua libertação foi sempre feita em locais seguros, nunca perto de cursos de água ou precipícios, de forma a evitar acidentes.

Todo o material utilizado foi desinfetado com toalhetas húmidas com desinfetante (Clinell™, Gama Healthcare Ltd) e devidamente acondicionado. Animais atropelados tanto selvagens como domésticos foram igualmente recolhidos para este estudo, por amostragem passiva, oportunisticamente no decurso das deslocações necessárias à execução do projeto.



Figura 1: Armadilha Tomahawk de duas entradas.



Figura 2: Caixa Armadilha de uma entrada.



Figura 3: Armadilha abrigada das condições ambientais com recurso a vegetação local e placas de cortiça.



Figura 4: Manipulação e monitorização anestésica de um felídeo.

- 2 - Canídeos domésticos/ferais

As recolhas de amostras foram efetuadas a cães de matilhas, tendo estas sido selecionadas de acordo com o facto de a sua atividade cinegética ser exercida nas zonas do projeto (Fig.5 e 6). Foi realizado um questionário ao proprietário da matilha com o objetivo de caracterizar o protocolo vacinal utilizado.

Após a contenção física dos animais, o sangue foi colhido da veia cefálica e/ou da veia safena, em função do comportamento e das dimensões do animal, bem como do calibre das veias. Para o efeito foram usadas agulhas de 23 ou 21 G, de uma polegada e meia e seringas descartáveis de 5 ml, tendo o sangue colhido sido colocado num tubo com ativador de coagulação. Posteriormente as amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 rotações por minuto durante 5 minutos numa centrífuga portátil (modelo 2615 Nahita®). O soro foi separado por pipetagem, colocado num tubo simples e armazenado a -18° Celcius, até ser enviado para o laboratório.



Figura 5: Instalações de uma matilha.



Figura 6: Cães de uma das matilhas amostradas.

- 3 - Outros carnívoros selvagens

Tal como os gatos-bravos, estes animais foram capturados, para recolha de amostras (sangue, zaragatoas fecais, conjuntivais, nasais e orofaríngeas), através do mesmo tipo de armadilhas acima descrito e com os mesmos cuidados anteriormente mencionados. Estes animais foram posteriormente anestesiados com combinações de medetomidina e quetamina, conforme o Protocolo de manipulação de carnívoros anteriormente referido e todos os procedimentos de manipulação, recolha de amostras e reanimação anteriormente descritos foram igualmente empregues em indivíduos deste grupo (Fig.7-10).

Adicionalmente foram também usados laços Collarum™, em raposas (*Vulpes vulpes*), para as quais o peso para cálculo de anestésicos foi estimado pelo operador mais experiente, sendo que a contenção física oferecida por este tipo de armadilha nos carnívoros aliada ao uso de uma manta foram suficientes para a manipulação do animal sem problemas (Fig.11).

Animais atropelados, legalmente caçados, assim como os que foram abatidos em ações de correção de densidade (presumivelmente por armadilhagem) autorizadas pelo Instituto de Conservação da Natureza e Florestas (ICNF) foram também incluídos na amostragem e congelados em arcas fornecidas pelo projeto (Fig.12-14).



Figura 7: Recolha de sangue da veia cefálica numa gineta capturada

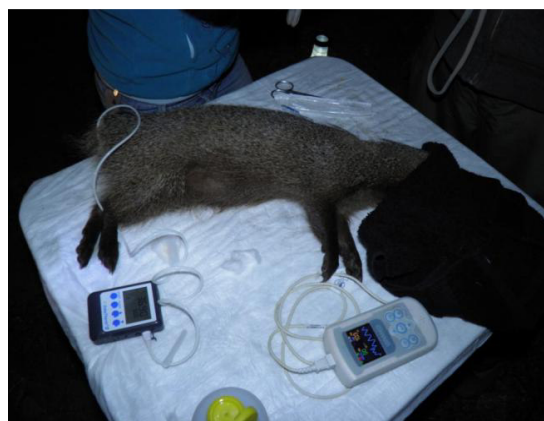


Figura 8: Manipulação e monitorização anestésica de um sacarrabos



Figura 9: Zaragatoas obtidas de uma gineeta capturada



Figura 10: Exame do estado geral, determinação de idade e obtenção de várias biometrias numa gineeta



Figura 11: Collarum em utilização, apenas o isco se destaca do solo



Figura 12: Recolha de sangue por punção cardíaca numa raposa caçada



Figura 13: Carnívoro selvagem atropelado



Figura 14: Recolha de um texugo morto por atropelamento

- 4 - Ungulados selvagens

As amostras de ungulados selvagens (sangue, por recolha de sangue livre na cavidade torácica, zaragatoas e tecidos) foram obtidas de animais caçados em montarias (Fig.15).



Figura 15: Montaria

- 5 – Lagomorfos & Roedores

As amostras deste grupo (fezes e urina) foram obtidas após captura dos animais por armadilhas de caixa do tipo Sherman™ de uma entrada (Fig.16). Estes animais foram manipulados por contenção física, sendo posteriormente libertados após a recolha destas amostras.

As amostras de lagomorfos (sangue, por punção cardíaca, zaragatoas e tecidos) foram obtidas maioritariamente durante as ações de caça, mas também para este grupo foram recolhidos, passivamente, animais atropelados.



Figura 16: Sherman em utilização

- 6 - Ixodídeos/Argasídeos

As carraças foram recolhidas da vegetação por *flagging* ou de animais capturados que se encontravam parasitados.

Para cada animal amostrado e incluído no estudo foi preenchida uma ficha de campo (Anexo I), identificada com um código alfanumérico que consistiu num número sequencial seguido das iniciais do responsável pela recolha de forma a identificar o animal e todas as amostras recolhidas durante o restante processamento.

Todas as amostras recolhidas foram encaminhadas para os polos de armazenamento e colheita de amostras localizados nas áreas de atuação do Projeto e em Lisboa. Os cadáveres bem como as carraças foram congelados no máximo 48 horas após recolha, mas devido ao atraso no início do processamento laboratorial pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) foi necessário proceder ao congelamento a -20°C de todos os restantes tipos de amostras.

O material recolhido de animais vivos ou mortos de lagomorfos foi subsequentemente cedido em concordância com o protocolo de colaboração técnico-científico celebrado entre a DGAV e a Universidade de Évora (UE), no âmbito de trabalhos de doutoramento em Ciências Veterinárias na última, subordinados ao tema "O papel dos leporídeos selvagens como reservatórios de agentes infecciosos".

As carraças foram ulteriormente entregues no Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac (CEVDI) - Águas de Moura para processamento e análise de hemoparasitas e outros agentes infecciosos, como forma indireta de estudo deste tipo de agentes nos restantes grupos de animais em análise.

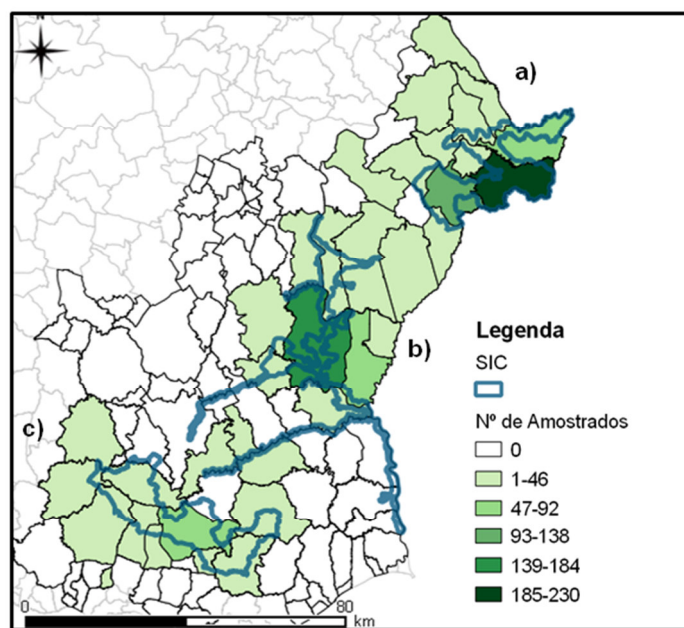
Todos estes animais e respetivas amostras foram acompanhados pelo Modelo 969/DGV e a respetiva versão do Modelo 975/DGV de forma a permitir uma uniforme recolha de dados para análise sobre: identificação do animal e estado clínico, identificação do local de recolha, identificação da amostra e respetiva conservação e exames de diagnóstico pretendidos.

Através destes procedimentos, de 2011 a 2014, foram amostrados 869 animais dos grupos 1 a 5 nas três áreas em estudo. Adicionalmente 169 carraças foram igualmente recolhidas da vegetação ou de animais capturados/encontrados pertencentes aos grupos 1 e 3 (Tabela 3 e Mapas 3-9).

Tabela 3: Amostragem por área no decurso do Projeto

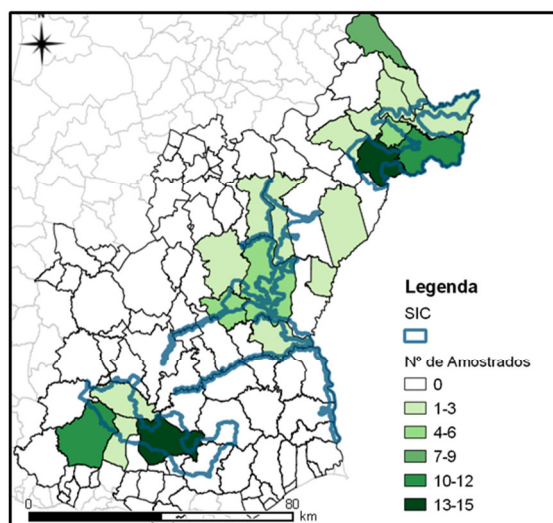
Grupo/Área	Amostragem (% Previsto)				
	Moura-Barrancos	Vale do Guadiana	Serra do Caldeirão	N.d/ Fora das áreas	Total
1 - Felídeos domésticos/ferais/selvagens	45 (47%)	20 (21%)	30 (33%)	1	96 (34%)
2 - Canídeos domésticos/ferais	121 (130%)	90 (97%)	99 (106%)	-	310 (111%)
3 - Outros carnívoros selvagens	94 (119%)	22 (26%)	32 (46%)	1	149 (63%)
4 - Ungulados selvagens	75 (121%)	45 (73%)	20 (32%)	-	140 (75%)
5 - Lagomorfos&Roedores	65 (105%)	71 (115%)	31(50%)	7	174 (94%)
6 - Ixodídeos/Argasídeos	57 (59%)	110 (113%)	2 (2%)		169 (58%)
Total	457 (93%)	358 (72%)	214 (45%)	9	1038 (71%)

N.d. não determinado

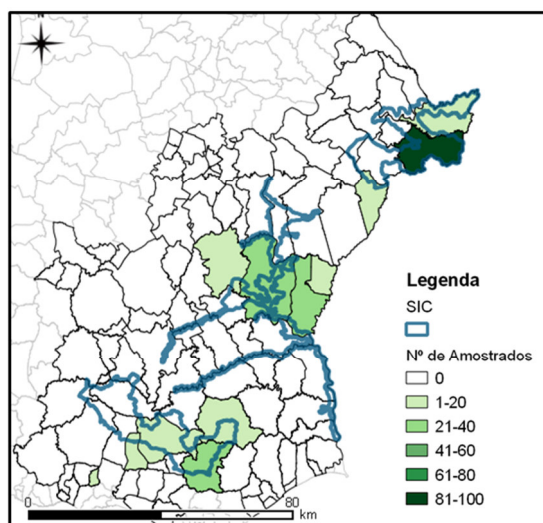


Mapa 3: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados

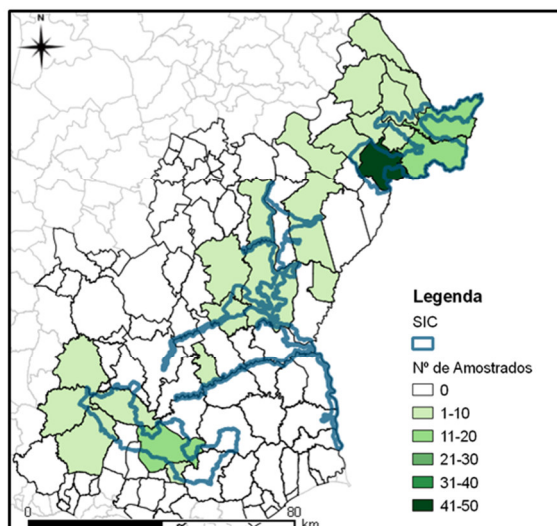
a) Moura-Barrancos, b) Vale do Guadiana, c) Serra do Caldeirão



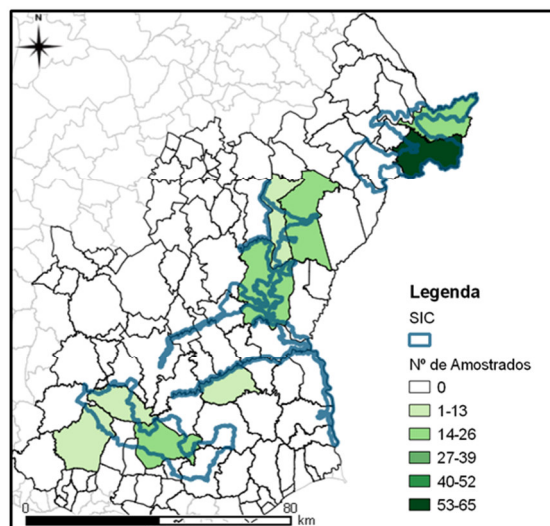
Mapa 4: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 1



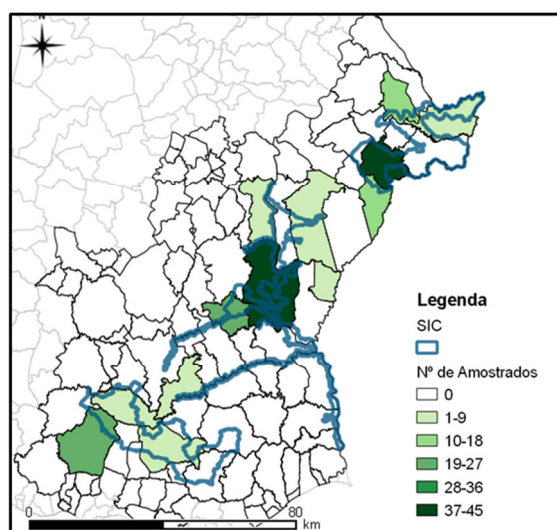
Mapa 5: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 2



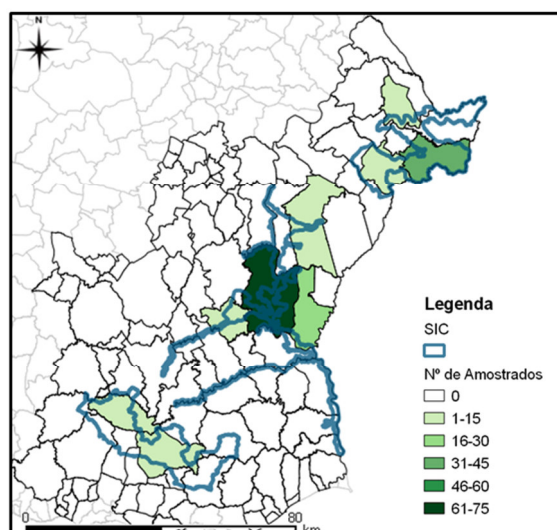
Mapa 6: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 3



Mapa 7: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 4



Mapa 8: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 5



Mapa 9: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 6

Tendo em conta os valores calculados para se obter uma amostragem representativa (disponíveis no documento LIFE08 NAT/P/000227/A7001), apenas o grupo 2 ultrapassou o valor estimado para a totalidade das áreas, ficando os demais aquém dos 100%. No entanto, para alguns grupos/áreas as colheitas situam-se próximo ou acima dos 100%. O grupo 1 foi de todos o que mais se afastou do valor ideal, contando apenas com 33,3% das amostras inicialmente preconizadas. Possivelmente este valor poderá estar relacionado com dificuldades na amostragem de animais fora de grandes centros urbanos (no caso de populações domésticas/assilvestradas) e até mesmo de captura e/ou esforços menos sistemáticos na mesma. A possível exibição de diferentes comportamentos que poderão levar ao atropelamento e capturas em armadilhas também poderá ter influenciado a percentagem de amostras conseguidas, face a um excesso de otimismo no cálculo da amostragem possível de obter. Condições meteorológicas adversas que se fizeram sentir durante os períodos de captura assim como limitações/condicionalismos nas áreas e períodos autorizados para armadilhagem pelo ICNF resultaram num número de amostras inferior ao

esperado em carnívoros selvagens (grupo 3). E tal como para o grupo 1, o número de cadáveres de animais atropelados que as equipas no terreno conseguiram detetar e recolher, foi menor do que o esperado.

Relativamente aos restantes grupos (4, 5 e 6), algumas das regiões ultrapassaram o que foi preconizado para a amostragem, mas nas restantes em que os valores ideais não foram alcançados, possivelmente, os condicionalismos observados nos grupos anteriores também poderão estar na origem deste desfasamento (particularmente no grupo 5), limitações de amostragem em montarias poderão ter ocorrido no caso do grupo 4 e o desenvolvimento dos ciclos de vida dos vetores do grupo 6 poderão não ter propiciado a sua recolha quer na vegetação ou nos animais capturados nos locais e datas em que se procedeu a esta recolha. É de referir que no caso da amostragem de lagomorfos do grupo 5 a epidemia de Doença Hemorrágica Viral em 2012/2013 foi outra condicionante que impediu atingir a amostragem prevista na Serra do Caldeirão.

Relativamente à amostragem por área, nenhuma atingiu a dimensão prevista, no entanto cerca de 93,5% das amostras de Moura-Barrancos foram recolhidas o que parece não ser concordante com a generalidade das estimativas das populações existentes nesta área, que de certo poderiam dificultar esta etapa do projeto nesta região quando comparadas com a região de Vale do Guadiana ou Serra do Caldeirão (onde espécimes dos vários grupos seriam, expetavelmente, mais abundantes e a percentagem de amostras conseguidas foi mais baixa - LIFE08 NAT/P/000227/A7001). No entanto, e por se tratar de apenas estimativas de populações e existindo vários fatores de difícil controlo e que podem condicionar a amostragem de animais, como a abundância de presas no caso de capturas, este desfasamento seria expectável.

Tabela 4: Espécies amostradas no decurso do Projeto

Grupo	Nome científico	Nome comum	Nº indivíduos	Proporção
1 - Felídeos domésticos/ferais/selvagens	<i>Felis catus</i>	Gato doméstico	87	90,6%
	<i>Felis silvestris</i>	Gato-bravo	5	5,3%
	<i>Felis sp.</i>	Gato	4	4,2%
2 - Canídeos domésticos/ferais	<i>Canis familiaris</i>	Cão doméstico	310	100%
3 - Outros carnívoros selvagens	<i>Vulpes vulpes</i>	Raposa	42	28,2%
	<i>Herpestes ichneumon</i>	Sacarrabos	46	30,9%
	<i>Genetta genetta</i>	Gineta	22	14,8%
	<i>Lutra lutra</i>	Lontra	5	3,4%
	<i>Martes foina</i>	Fuínha	14	9,4%
	<i>Meles meles</i>	Texugo	9	6%
	<i>Mustela putorius</i>	Toirão	11	7,4%
4 - Ungulados selvagens	<i>Sus scrofa</i>	Javali	71	50,7%
	<i>Cervus elaphus</i>	Veado	61	43,6%
	<i>Dama dama</i>	Gamo	6	4,3%
	<i>Ovis ammon</i>	Muflão	2	1,4%
5 - Lagomorfos & Roedores	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Coelho-bravo	49	28,2%
	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Rato-do-campo	13	7,5%
	<i>Mus spretus</i>	Rato-das-hortas	108	62,1%

6 Ixodídeos/Argasídeos	<i>Rattus norvegicus</i>	Ratazana-castanha	3	1,7%
	<i>Elomys quercinus</i>	Leirão	1	0,6%
	<i>Dermacentor marginatus</i>		12	7,1%
	<i>Hyalomma lusitanicum</i>		114	67,5%
	<i>Ixodes ricinus</i>		3	1,8%
	<i>Rhipicephalus bursa</i>		7	4,1%
	<i>Rhipicephalus pusillus</i>		21	12,4%
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		10	5,9%
	Não determinado		2	1,2%

Continuação da Tabela 4

O processo de amostragem permitiu, deste modo, a recolha para os grupos 1 a 5 de 1895 amostras, de 26 espécies diferentes, compreendendo sangue, soro, fezes, urina, variados órgãos (baço, fígado, pulmões e linfonodos), zaragatoas de várias mucosas (nasal, orofaríngea, conjuntival e rectal) e cadáveres (tabela 4 e 5).

Tabela 5: Tipos de amostras recolhidas por grupo

Grupo/Matrizes	Sangue/soro	Zaragatoas	Fezes/urina	Órgãos	Cadáveres	Total
1 - Felídeos domésticos/ferais/selvagens	77	391	0	0	19	487
2 - Canídeos domésticos/selvagens	310	0	0	0	0	310
3 - Outros carnívoros selvagens	86	314	0	0	63	463
4 - Ungulados selvagens	131	8	0	196	0	335
5 - Lagomorfos & Roedores	37	93	158	6	6	300
Total	641	806	158	202	88	1895

Apesar de apresentarem resultados laboratoriais, as amostras colhidas fora das áreas determinadas ou para as quais não foi possível determinar a área de colheita (n=9) não foram consideradas para os cálculos de prevalências.

Tal como previsto no estudo inicial foram ainda utilizados dados de prevalência dos programas oficiais da DGAV em curso, nomeadamente do Programa de Erradicação e Vigilância da Tuberculose Bovina, do Programa de Erradicação e Vigilância da Brucelose Bovina, do Programa de Erradicação da Brucelose dos Pequenos Ruminantes e do Plano de Controlo e Erradicação da Doença de Aujeszky.

3.2 Análise dos dados

A análise/avaliação estatística dos dados recolhidos e resultados dos exames de diagnóstico pedidos consistiu na organização e compilação de toda a informação conseguida no decurso do projeto incluindo os Modelos 969 e 975/DGV (compilados em base de dados digital em Microsoft Office Excel®), os Boletins de análise enviados pelos laboratórios (incluindo ficheiros digitais em Microsoft Office Excel® e Microsoft Office Access®) e os dados dos Programas Oficiais já mencionados.

Para cada doença e por área do projeto foi contabilizado o número de animais amostrados, o número de animais cujas amostras foram processadas para cada ensaio² (total de resultados positivos, negativos e prejudicados), o número de resultados prejudicados, o número de animais que teve resultado válido - positivo ou negativo - ("testados") e o número de animais que teve resultado positivo.

As prevalências para cada doença foram calculadas segundo o método de Sterne com intervalo de confiança de 95%, tendo em consideração a Sensibilidade e Especificidade de cada teste quando disponível, sendo que para alguns dos agentes foi assumida como 100%, sendo referido em cada caso. A determinação de diferenças significativas entre prevalências nas 3 áreas em estudo foi igualmente analisada com recurso ao teste de independência do chi quadrado ou o teste exato de Fisher, este último quando as frequências esperadas fossem inferiores a 5 ou 1. Diferenças encontradas nestes dois testes foram consideradas significativas se $p < 0,05$. Esta análise estatística e epidemiológica foi efetuada no *software* R © versão 2.15.3. desenvolvido pela R Foundation for Statistical Computing e disponível *online* em *open-source*.

Para melhor compreensão espacial dos dados e resultados obtidos (totais e para as três regiões em análise), mapas por freguesias com as freguesias positivas, negativas e não testadas foram equacionados e encontram-se aqui presentes. Com o intuito de apresentar um maior detalhe na representação geo-espacial desta informação, mapas (também por freguesia) com o número de animais amostrados, testados e percentagens de positividade encontram-se no Anexo III. Todos estes elementos foram realizados com recurso ao *software* Quantum GIS®, versão 1.8.0 "Lisboa" da GNU Public License (e respetivas extensões) e ArGIS Desktop 10.0 da ESRI®, tendo por base a Carta Administrativa Oficial de Portugal - CAOP, versão 2012.1, disponibilizada pelo IGP no sistema de referência PT-TM06/ETRS89 (European Terrestrial Reference System 1989, EPSG:3763).

² Nem todas as amostras entregues no INIAV foram processadas laboratorialmente, maioritariamente por adiantado estado de autólise dos cadáveres ou por condicionantes técnicas relacionadas com o próprio laboratório.

4 Resultados

4.1 Imunodeficiência felina (FIV)

Tabela 6: Amostragem efetuada para Imunodeficiência felina

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	45	43	1	20	19	0	30	30	0
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

As amostras foram analisadas para detetar a exposição das populações domésticas/ferais/selvagens deste grupo ao vírus da imunodeficiência felina (FIV) pelo método de ELISA indireto com o *kit* 16.FIV.K1 da Ingenasa, apresentando sensibilidade e especificidade de respetivamente 95% e 98%.

Deste total, apenas 92 foram processados para esta metodologia (Tabela 6).

Tabela 7: Prevalências de anticorpos anti-FIV nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	91	5	5,5%	3,8%	0,2-11,2%
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-

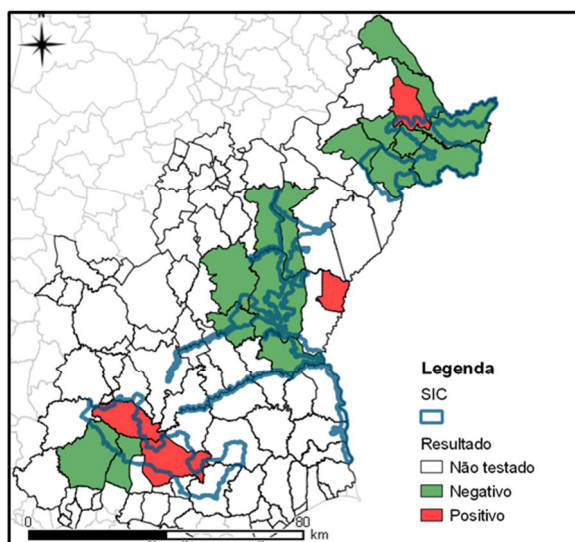
T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tabela 8: Prevalências de anticorpos anti-FIV nas áreas e grupos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	42	1	2,4%	0,4%	0-11,5%	19	1	5,3%	3,5%	0-25,5%	30	3	10%	8,6%	0,8-26,2%
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Em cinco felídeos, todos gatos domésticos, foram detetados anticorpos contra o FIV: um em Moura-Barrancos (Amareleja em Moura), outro no Vale do Guadiana (Corte do Pinto em Mértola) e três na zona da Serra do Caldeirão - um em São Barnabé (Almodôvar) e dois em Salir (Loulé). A prevalência calculada para o conjunto das três áreas foi de 5,5%, mas quando considerando a prevalência calculada para cada uma das regiões estas poderão indicar que um maior número de indivíduos expostos encontrar-se-á na região da Serra do Caldeirão, contudo não foram encontradas diferenças significativas entre estes valores, $p_{\text{Fisher}}=0,3565$ (Tabela 7 e 8).



Mapa 10: Freguesias testadas para a presença de anticorpos anti-FIV

4.2 Leucemia felina (FeLV)

Tabela 9: Amostragem efetuada para Leucemia felina

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	45	43	1	20	20	1	30	30	0
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

A infeção pelo vírus da Leucemia felina (FeLV) foi detetada nas amostras de soro e cadáveres de felídeos, pela presença do antígeno p27 pelo método de ELISA de duplo anticorpo com o *kit* 16.FLV.K2 da Ingenasa (sensibilidade e especificidade de respetivamente 95% e 98%).

Novamente apenas 93 animais dos 95 foram analisados (Tabela 9).

Tabela 10: Prevalência do antígeno p27 de FeLV nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	91	14	15,4%	14,4%	7,7-24,3%
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-

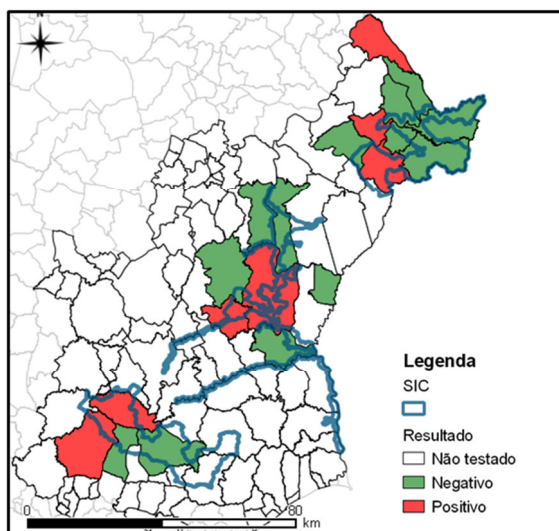
T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tabela 11: Prevalências de antígeno p27 de FeLV nas áreas e grupos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	42	7	16,7%	15,8%	6,4-31%	19	2	10,5%	9,2%	0-31,8%	30	5	16,7%	15,8%	5,2-35,2%
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Catorze animais estavam infetados por FeLV, a grande maioria tendo sido amostrada em Moura-Barrancos e Serra do Caldeirão, respetivamente Sobral de Adiça em Moura e São Bartolomeu de Messines em Silves, sendo que nenhum dos felídeos positivos era um exemplar da espécie *F. silvestris* ou híbrido. A prevalência encontrada para o total das áreas amostradas foi superior à encontrada relativamente ao FIV, 15,4%, no entanto e como na doença anterior, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as prevalências de deteção deste antígeno nas várias áreas em estudo, $p_{\text{Fisher}}=0,8651$ (Tabela 10 e 11).



Mapa 11: Freguesias testadas para a presença do antígeno p27

4.3 Panleucopénia felina e Parvovirose canina (PV)

Relativamente às Parvovirose, amostras de soro de canídeos foram analisadas para a presença de anticorpos contra o vírus da Parvovirose (PV) com o *kit* 15.CPV.K1 da Ingenasa por ELISA indireto (sensibilidade 95% e especificidade 98%), enquanto os restantes tipos de amostras (zaragatoas e cadáveres) nos restantes grupos foram submetidos a real time PCR (sensibilidade variável, assumida como 100%, e

especificidade de 98%) em concordância com as metodologias de Decaro *et al.* (2005) e Duarte *et al.* (2013)³.

Tabela 12: Amostragem efetuada para Panleucopénia felina e Parvovirose canina

	Tipo	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
		Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	v	45	44	2	20	20	1	30	30	0
Grupo 2	Ac	121	121	0	90	90	0	99	99	0
Grupo 3	v	94	90	8	22	19	3	32	31	1
Grupo 4		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Tipo - tipo de teste: determinação da presença de vírus (v) ou deteção de anticorpos (Ac)

Novamente o número de animais processados para análise difere dos amostrados (Tabela 12).

Tabela 13: Prevalência de exposição a Parvovirus nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	91	45	49,5%	48,4%	37,7-59,1%
Grupo 2	310	276	89%	93,6%	89,3-96,9%
Grupo 3	128	57	44,5%	43,4%	34,6-52,6%
Grupo 4	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tabela 14: Prevalências de exposição a Parvovirus nas áreas e grupos em estudo

	Tipo	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
		T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	v	42	13	31%	29,5%	17,2-45,3%	19	9	47,4%	46,3%	24,2-68,2%	30	23	76,7%	76,2%	57,6-88,6%
Grupo 2	Ac	121	107	88,4%	92,9%	85,5-97,9%	90	78	86,7%	91%	81,6-97,2%	99	91	91,9%	96,7%	88,7-100%
Grupo 3	v	82	33	40,2%	39%	28,3-50,2%	16	10	62,5%	61,7%	35,9-81,9%	30	14	46,7%	45,6%	28,3-64,5%
Grupo 4		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tipo - tipo de teste: determinação da presença de vírus (v) ou deteção de anticorpos (Ac)

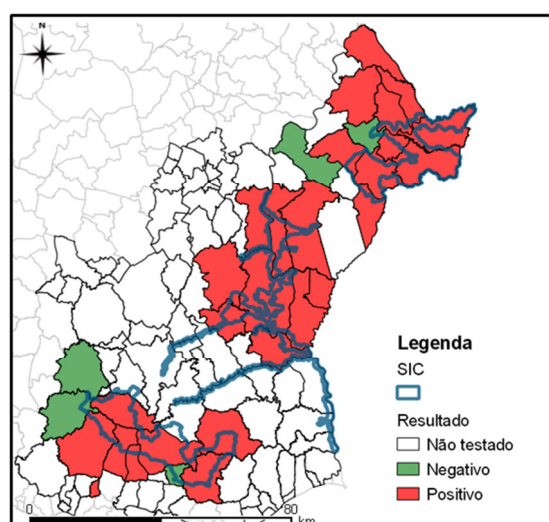
Trezentos e setenta e oito animais testados acusaram positivo para exposição/presença de Parvovirus nas amostras usadas (Tabela 13), sendo positivas as amostras recolhidas de indivíduos das espécies: *F. catus* (n=43), *Felis sp.* (n=2), *Canis familiaris* (n=276), *V. vulpes* (n=15), *G. genetta* (n=11), *M. meles* (n=3), *M. putorius* (n=3), *M. foina* (n=2), *H. ichneumon* (n=21) e *L. lutra* (n=2). Estes resultados traduziram-se em prevalências superiores à maioria das restantes doenças em análise. Ao compará-las por região (Tabela 14), diferenças significativas foram encontradas no grupo 1 com

³Decaro, N.; Elia, G.; Martella, V.; Desario, C.; Campolo, M.; Trani, L.D.; Tarsitano, E.; Tempesta, M. & Buonavoglia, C. (2005): A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology* 105, 19-28.

Duarte, M. D.; Henriques, A. M.; Barros, S. C.; Fagulha, T.; Mendonça, P.; Carvalho, P.; Monteiro, M.; Fevereiro, M.; Basto, M. P.; Rosalino, L. M.; Barros, T.; Bandeira, V.; Fonseca, C. & Cunha, M.V. (2013): Snapshot of viral infections in wild carnivores reveals ubiquity of Parvovirus and susceptibility of Egyptian mongoose to feline Panleukopenia virus. *PlosOne* doi:10.1371/journal.pone.0059399.

provavelmente a região da Serra do Caldeirão representando a região com maior prevalência de infecção para este grupo ($\chi^2= 14,672$; g.l.=2; $p=0,0006517$). Contudo a densidade destes animais nos locais de amostragem, a agregação espacial dos mesmos ou até a frequência de contacto entre eles podem estar a influenciar este resultado. Aliás o número de positivos poderá ser devido a situações de passagem transitória do vírus pelo organismo ou mesmo eliminação de vírus vacinal (desconhece-se o estado vacinal dos elementos do grupo 1), pelo que esta significância poderá ser um reflexo destas situações e não constituir uma representação de que uma região apresenta realmente uma prevalência mais elevada de infecção.

No grupo 3 as diferenças entre regiões não foram consideradas significativas ($\chi^2=2,757$; g.l.= 2, $p=0,252$), assim é também o caso do grupo 2, dos canídeos domésticos ($\chi^2= 1,4057$; g.l. = 2, $p= 0,4952$). É de reter que neste último grupo as prevalências, apesar de elevadas, poderão não ser indicativas de exposição deste grupo nestas áreas uma vez que a grande maioria foi vacinada para a doença ($n=103$ em adulto e $n=276$ em cria) e o teste é incapaz de diferenciar anticorpos vacinais dos desenvolvidos contra estirpes em circulação, que por sua vez poderão estar presentes mesmo em animais vacinados.



Mapa 12: Freguesias testadas para a presença de anticorpos ou material genético de Parvovirus

4.4 Esgana (CDV)

Tabela 15: Amostragem efetuada para Esgana

		Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Tipo	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	v	45	44	2	20	20	1	30	30	0
Grupo 2	Ac	121	121	0	90	90	0	99	99	0
Grupo 3	v	94	91	8	22	19	3	32	31	1
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Tipo - tipo de teste: determinação da presença de vírus (v) ou deteção de anticorpos (Ac)

À semelhança da doença anterior também amostras de soro de canídeos domésticos foram analisadas para a presença de anticorpos contra o vírus da esgana (CDV) por ELISA indireto, mas com o *kit* 15.CDG.K1 da Ingenasa (sensibilidade 95% e especificidade 98%), enquanto os restantes tipos de amostras (zaragatoas e cadáveres) foram submetidos a real time RT-PCR (sensibilidade superior a 95% e especificidade de 98%) segundo a metodologia de Fevereiro *et al.* (2006)⁴.

Praticamente os mesmos indivíduos que não foram analisados anteriormente para as Parvoviroses, por sua vez, também não o foram para esta doença (Tabela 15).

Tabela 16: Prevalências de exposição ao vírus da Esgana nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	91	0	0%	0%	0-2,3%
Grupo 2	310	308	99,4%	100%	100-100%
Grupo 3	129	0	0%	0%	0-1%
Grupo 4	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tabela 17: Prevalências de exposição ao vírus da Esgana nas áreas e grupos em estudo

	Tipo	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
		T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	v	42	0	0%	0%	0-7,4%	19	0	0%	0%	0-16,7%	30	0	0%	0%	0-9,8%
Grupo 2	Ac	121	120	99,2%	100%	100-100%	90	90	100%	100%	100-100%	99	98	99%	100%	99,6-100%
Grupo 3	v	83	0	0%	0%	0-2,7%	16	0	0%	0%	0-20,3%	30	0	0%	0%	0-9,8%
Grupo 4		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

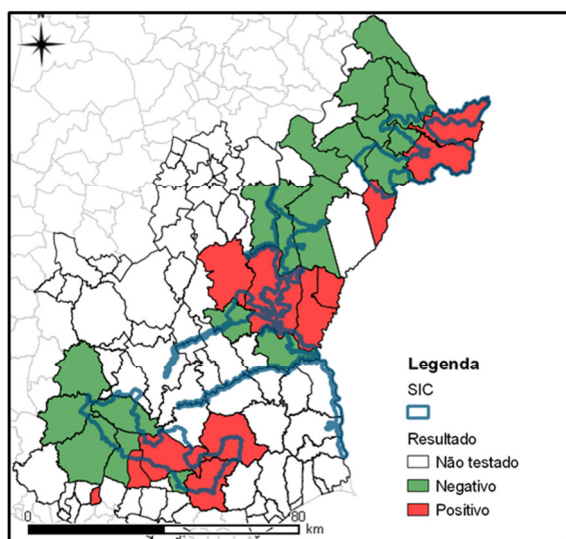
T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tipo - tipo de teste: determinação da presença de vírus (v) ou deteção de anticorpos (Ac)

Novamente o grupo 2 apresentou prevalências elevadas para deteção de anticorpos tanto em termos globais (Pa=99,4%; PR=100%, IC=100-100%) como por região (Tabela 16 e 17). No entanto, este grupo, na sua grande maioria, também foi vacinado contra Esgana (n=115 em adulto e n=308 em cria) pelo que as prevalências calculadas poderão não ser o melhor indicador de exposição natural nas regiões em estudo. Nos restantes grupos nenhum animal testado foi positivo para a presença do vírus e como tal as prevalências calculadas foram 0% tanto em termos gerais, como por região (tabela 16 e 17).

Não foram encontradas diferenças significativas entre as áreas em estudo para os três grupos em análise ($p_{\text{Fisher}}=1$).

⁴Fevereiro, M.; Duarte, M.; Fagulha, T.; Ramos, F.; Barros, S.; Henriques, A.M. & Cruz, B. (2006): Rapid detection of canine distemper virus by real-time RT-PCR. *7th International Congress of Veterinary Virology, Lisbon, Portugal, 24-27 September*. p234.



Mapa 13: Freguesias testadas para a presença de material genético do vírus da Esgana ou anticorpos

4.5 Peritonite infecciosa felina e Coronavirose canina (CoV)

Amostras de soro de felídeos (incluindo de cadáveres) e canídeos foram analisadas para a presença de anticorpos anti-coronavírus (CoV) com os kits 16.FVC.K1 e 15.CCV.K1 da Ingenasa por ELISA indireto (sensibilidade 95% e especificidade 98%), enquanto os restantes tipos de amostras dos grupos 1 e 3 (zaragatoas e cadáveres) foram submetidos a real time RT-PCR (sensibilidade superior a 95% e especificidade de 98%) segundo adaptação do método descrito por Gut *et al.* (1999)⁵

Tabela 18: Amostragem efetuada para Coronavírus

		Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Tipo	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	Ac	45	38	0	20	15	0	30	29	0
	v	45	16	3	20	11	1	30	9	0
Grupo 2	Ac	121	121	0	90	90	0	99	99	0
Grupo 3	v	94	91	8	22	19	3	32	31	1
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Tipo - tipo de teste: determinação da presença de vírus (v) ou deteção de anticorpos (Ac)

No grupo 3, amostras de sete animais não foram sujeitas a PCR (Tabela 18).

⁵ Gut, M.; Leutenegger, C. M.; Huder, J. B.; Pedersen, N. C. & Lutz, H. (1999): One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *Journal of Virological Methods* 77, 37-46.

Tabela 19: Prevalências de exposição a Coronavírus nos grupos em estudo

	Tipo	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	Ac	82	5	6,1%	4,4%	0,5-12,7%
	v	32	0	0%	0%	0-9,1%
Grupo 2	Ac	310	274	88,4%	92,9%	88,4-96,4%
Grupo 3	v	129	3	2,3%	0,4%	0-5,2%
Grupo 4		0	-	-	-	-
Grupo 5		0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%
 Tipo - tipo de teste: determinação da presença de vírus (v) ou deteção de anticorpos (Ac)

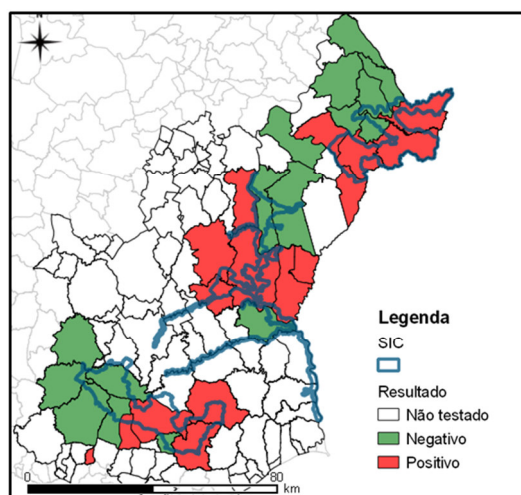
Tabela 20: Prevalências de exposição a Coronavírus nas áreas e grupos em estudo

Moura-Barrancos							Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	Tipo	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	Ac	38	3	7,9%	6,3%	0,2-20,2%	15	1	6,7%	5%	0-30,3%	29	1	3,4%	1,6%	0-16%
	v	13	0	0%	0%	0-22%	10	0	0%	0%	0-29,1%	9	0	0%	0%	0-32,6%
Grupo 2	Ac	121	98	81%	84,9%	76,1-91,7%	90	79	87,8%	92,2%	82,8-98,3%	99	97	98%	100%	97,5-100%
Grupo 3	v	83	2	2,4%	0,4%	0-6,7%	16	1	6,3%	4,6%	0-30,7%	30	0	0%	0%	0-9,8%
Grupo 4		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%
 Tipo - tipo de teste: determinação da presença de vírus (v) ou deteção de anticorpos (Ac)

Cinco gatos domésticos (a maioria do Concelho de Moura) apresentavam anticorpos anti-CoV e em três (dois em Moura, na freguesia de Santo Aleixo da Restauração, e um em Quintos, Beja) em que foram feitos ensaios paralelos com PCR, não se detetou material genético viral. Considerando os restantes carnívoros, só dois *H. ichneumon*, no Sobral da Adiça, em Moura e São João dos Caldeireiros, em Mértola e uma *G. genetta* em Barrancos foram positivos para a presença deste agente. As prevalências calculadas para a totalidade das três zonas nestes dois grupos em estudo foram de 6,1%, 0% e 2,3% (Pa) e 4,4%, 0% e 0,4% (PR) para variações de 0,5-12,7%, 0-9,1% e 0-5,2%, respetivamente para as duas metodologias dos grupos 1 e o 3 (Tabela 19). Relativamente a diferenças entre regiões para estes grupos nenhuma diferença significativa foi identificada ($p_{\text{Fisher}} > 0,4$).

Relativamente ao grupo dos canídeos domésticos, as prevalências encontradas para a deteção de anticorpos foi também elevada (Tabela 19 e 20), contudo há que ter em conta que, segundo informação dos proprietários, nenhum dos animais amostrados foi vacinado contra esta doença e, como tal, os valores positivos aqui em consideração não podem ser compreendidos como possíveis indicadores de uma boa cobertura vacinal (como nas duas doenças anteriores), mas sim como indicadores de exposição real ao vírus em circulação. Outro aspeto a salientar, prende-se com o facto de se terem determinado diferenças significativas entre estas prevalências nas três áreas do projeto, estando provavelmente a região da Serra do Caldeirão a apresentar maiores prevalências ($\chi^2 = 15,3552$; g.l.=2; $p=0,0004631$).



Mapa 14: Freguesias testadas para a presença de material genético de Coronavírus e/ou anticorpos anti-Coronavírus

4.6 Calicivirose felina (FCV)

Zaragatoas orofaríngeas, nasais, conjuntivais e rectais bem como cadáveres de vários felídeos foram sujeitos a PCR para deteção da presença do calicivirus felino (FCV), de acordo com uma adaptação ao método descrito por Wilhelm *et al.* (2006)⁶, com sensibilidade superior a 95% e especificidade de 98%.

Tabela 21: Amostragem efetuada para Calicivirose felina

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	45	43	1	20	20	1	30	30	0
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Em dois felídeos, as amostras recolhidas não foram submetidas a ensaio (Tabela 21).

Tabela 22: Prevalências de exposição ao Calicivirus nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	91	16	17,6%	16,8%	9,5-26,7%
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

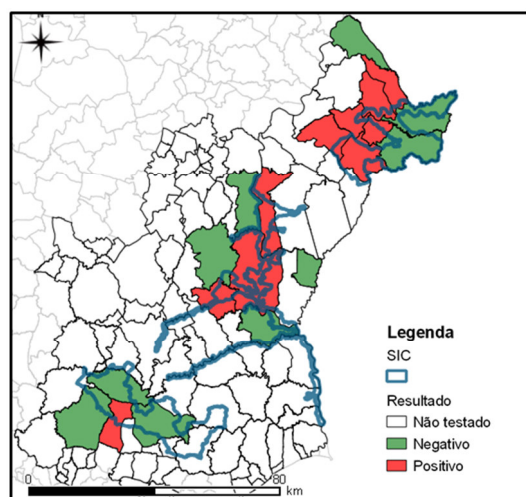
⁶Wilhelm, S. & Truyen, U. (2006). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay to detect a broad range of feline calicivirus isolates. *J Virol Methods*, 133(1), 105-8

Tabela 23: Prevalências de exposição ao Calicivirus nas áreas e grupos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	42	10	23,8%	23,5%	11,5-40%	19	4	21,1%	20,5%	5,9-45,8%	30	2	6,7%	5%	0-20,8%
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Amostras de dezasseis felídeos (n=14 *F. catus*, n=1 *F. silvestris* e um *Felis sp.*) deram positivo para a presença de FCV (Tabela 22), sendo as prevalências para a deteção deste agente nas três áreas do projeto 17,6% (Pa), 16,8% (PR), de 9,5-26,7% (IC). A grande maioria foi capturada ou encontrada morta na região de Moura-Barrancos, contudo quando comparando as prevalências calculadas entre áreas (Tabela 23), nenhuma diferença significativa foi encontrada e possivelmente nenhuma destas zonas apresenta uma maior prevalência ou de uma forma indireta maior probabilidade de exposição a este vírus ($p_{\text{Fisher}}=0,1327$).



Mapa 15: Freguesias testadas para a presença de material genético de Calicivirus felino

4.7 Doença de Aujeszky (ADV)

A infeção ou exposição ao vírus da Doença de Aujeszky (ADV) foi determinada no grupo 4 com amostras de órgãos e soro. Amostras para deteção de anticorpos contra este vírus foram sujeitas a ELISA de bloqueio de competição da proteína viral g7 com o kit 11.GEP.K.3 da Ingenasa de sensibilidade e especificidade superiores a 98,9% e 99,8%, respetivamente. No entanto, algumas amostras de soro foram antes submetidas a ELISA indireto (método interno) com resultados 100% concordantes em testes de proficiência interlaboratoriais. Para determinação da presença do vírus nos órgãos recolhidos, a técnica usada foi o PCR, segundo a metodologia de Hyun *et al.* (2005), com sensibilidade de 95% e especificidade de 98%.

Tabela 24: Amostragem efetuada para Doença de Aujeszky

		Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Tipo	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 2		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 4	Ac	19	14	0	32	24	0	20	19	0
	v	19	4	0	32	7	0	20	4	0
Grupo 5		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Tipo - tipo de teste: determinação da presença de vírus (v) ou deteção de anticorpos (Ac)

Mesmo tendo sido feitos ensaios em paralelo, não foram efetuados ensaios em dois javalis, um de Moura-Barranco e o outro do Vale do Guadiana (Tabela 24).

Tabela 25: Prevalências de exposição ao vírus da Doença de Aujeszky nos grupos em estudo

	Tipo	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1		0	-	-	-	-
Grupo 2		0	-	-	-	-
Grupo 3		0	-	-	-	-
Grupo 4	Ac	57	9	15,8%	15,8%	8,1-28,1%
	v	15	0	0%	0%	0-21,7%
Grupo 5		0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tabela 26: Prevalências de exposição ao vírus da Doença de Aujeszky nas áreas e grupos em estudo

		Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	Tipo	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 2		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4	Ac	14	1	7,1%	7%	0,17-31,9%	24	7	29,2%	29,3%	13,9-50,5%	19	1	5,3%	5,1%	0,07-25,8%
	v	4	0	0%	0%	0-54,5%	7	0	0%	0%	0-38,4%	4	0	0%	0%	0-54,5%
Grupo 5		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tipo - tipo de teste: determinação da presença de vírus (v) ou deteção de anticorpos (Ac)

Para a totalidade das três regiões as prevalências calculadas para esta virose, tanto para o método de deteção de anticorpos como o de identificação de material viral, foram diferentes e respetivamente de 15,8% e 0% (Pa), 15,8% e 0% (PR) em intervalos de 8,1-28,1% e 0-21,7% (Tabela 25).

Nove *Sus scrofa*, maioritariamente caçados nas freguesias de Salvador e Santa Maria, na região do Vale do Guadiana, testaram positivo pelos métodos de ELISA, indicando que possivelmente houve exposição ao agente. Contudo, e apesar desta região apresentar uma prevalência maior que as restantes (Tabela 26), não se encontraram diferenças significativas entre elas, quer com os dados pelo método de ELISA quer com os de PCR (respetivamente $p_{\text{Fisher}}=0,07$ e $p_{\text{Fisher}}=1$).

Tendo em conta os dados para suínos domésticos abrangidos pelo Plano de Controlo e Erradicação da Doença de Aujeszky (PCEDA) em 2013, para regimes em extensivo⁷, a prevalência global foi de 21,1%, PR=21,1%, IC=18,5-24% (Tabela 27) e diferenças significativas foram encontradas entre regiões ($\chi^2=73.7737$, df = 2, p< 0,05), estando a zona do Vale do Guadiana a apresentar provavelmente o maior número de casos positivos (Tabela 28).

Tabela 27: Prevalências de anticorpos anti-herpesvirus suíno em espécies domésticas

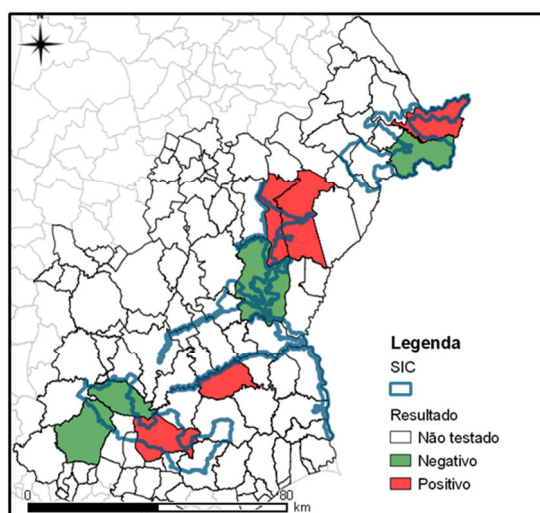
	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 4 - PCEDA	876	185	21,1%	21,1%	18,5-24%

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

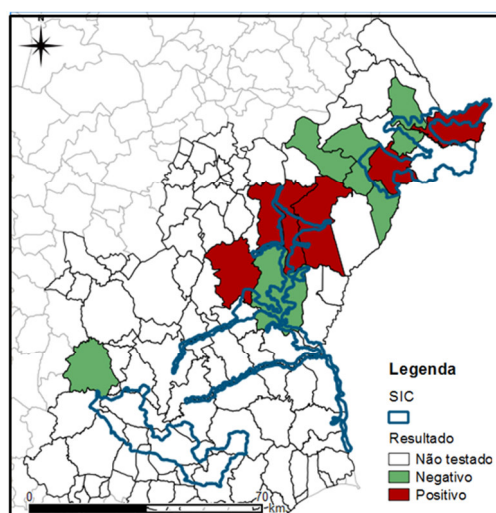
Tabela 28: Prevalências para a presença de anticorpos para a Doença de Aujeszky nas áreas e grupos de ungulados domésticos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 4- PCEDA	449	50	11,1%	11,1%	8,4-14,4%	398	135	33,9%	33,9%	29,4-38,8%	29	0	0%	0%	0-11,5%

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%



Mapa 16: Freguesias testadas para a presença de material genético e/ou anticorpos anti-herpesvirus suíno em populações selvagens



Mapa 17: Freguesias testadas no âmbito do PCEDA

4.8 Tuberculose Bovina (*Mycobacterium bovis*)

As amostras recolhidas de órgãos, cadáveres, soros e zaragatoas foram processados e analisadas segundo as orientações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE)⁸ para isolamento e identificação de *Mycobacterium* sp.⁹ não sendo aplicáveis valores

⁷Animais de explorações de montanha não foram considerados por não serem alvo de controlos serológicos.

⁸OIE (2013). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2013. capítulo 2.4.7.f

⁹Exceto *M. paratuberculosis*.

de sensibilidade e especificidade a esta metodologia de diagnóstico, para a análise dos dados assumiu-se que os mesmos seriam 100%.

Tabela 29: Amostragem efetuada para Tuberculose

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	94	78	45	22	13	6	32	30	27
Grupo 4	75	18	0	45	0	0	20	10	0
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Dos 288 animais pertencentes aos grupos 3 e 4 e que foram amostrados, apenas as amostras de 149 foram processadas (Tabela 29).

Um inconveniente imediato desta situação torna-se claro na análise do número de indivíduos do grupo 4 que não puderam ser processados na zona do Vale do Guadiana (n=45), o que subsequentemente dificulta a determinação de prevalências e a sua comparação. Apesar deste sucedido, amostras de 5 destes animais foram processadas em paralelo no âmbito de uma tese de doutoramento¹⁰ cujo autor gentilmente cedeu mais 39 resultados, selecionados aleatoriamente, de ungulados selvagens caçados na região de Vale do Guadiana, para tentar colmatar esta falta de informação nesta zona e que serão aqui incluídos para a análise desta doença.

Tabela 30: Prevalências de exposição a micobactérias do complexo da Tuberculose nos grupos em estudo neste projeto

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	0	-	-	-	-
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	43	1	2,3%	2,3%	0,1-12,4%
Grupo 4	28	2	2,8%	2,8%	0,5-9,5%
Grupo 5	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tabela 31: Prevalências de exposição aos agentes da Tuberculose nas áreas e grupos em estudo neste projeto

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	33	1	3%	3%	0,2-16,1%	7	0	0%	0%	0-37,7%	3	0	0%	0%	0-63,2%
Grupo 4	18	2	11,1%	11,1%	2-33%	0	-	-	-	-	10	0	0%	0%	0-29,1%
Grupo 5	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Apenas em três espécimes foram isoladas bactérias do género *Mycobacterium*: *Mycobacterium caprae* numa *G. genetta* adulta capturada no Sobral de Adiça em Moura-Barrancos e *Mycobacterium bovis* num *Sus scrofa* adulto e num muflão juvenil

¹⁰ Santos, N. (n.d). *Tuberculosis in wild ungulates in the Iberian Peninsula: applying new methods for the epidemiological analysis of intra and inter-species transmission*. Tese de doutoramento em realização. Metodologia no Anexo II.

em Santo Aleixo da Restauração em Moura-Barrancos, ambos exibindo lesões aquando da recolha de amostras em montarias. Por outro lado, num *Sus scrofa* do Concelho de Serpa (Vale do Guadiana) foram encontradas lesões macroscópicas compatíveis com Tuberculose mas o isolamento bacteriológico e a identificação por PCR foram negativos para a presença de microrganismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Adicionalmente 3 exemplares adultos de javali (*Sus scrofa*) e 6 de veado (*Cervus elaphus*), todos de Santo Aleixo da Restauração, também com lesões sugestivas de Tuberculose foram registadas aquando da recolha de amostras em montarias. Contudo, estes animais aparentemente pertencem ao grupo dos que não foram processados para esta doença por falta de meios, pelo que não existe confirmação de que *Mycobacterium bovis* ou outro elemento do complexo seja o agente causador destes quadros.

Apesar destes condicionalismos na análise laboratorial, as prevalências obtidas para isolamento desta bactéria no total das três regiões foram de 2,3% (Pa e PR) para o grupo 3 e 2,8% (Pa e PR) para o grupo 4, para intervalos de respetivamente 0,1-12,4% e 0,5-9,5% (Tabela 30). Considerando possíveis diferenças entre estas regiões (Tabela 31), incluindo os dados cedidos (ficando o Vale do Guadiana representado por: 0% Pa, 0% PR, 0-8,5% IC) estas não foram significativas ($p_{\text{Fisher}} > 0,08$).

Tendo em conta os dados de ruminantes domésticos abrangidos pelo Programa de Erradicação e Vigilância da Tuberculose Bovina (PEVTB) nos anos 2012 e 2013, a prevalência global para 2012 foi de 0,221% (PR=0%, IC=0-0%) e para 2013 foi de 0,196% (PR=0%, IC=0-0%) e diferenças significativas foram encontradas entre regiões para ungulados domésticos ($p_{\text{Fisher}} < 0,05$) para qualquer um dos anos, estando a zona de Moura-Barrancos a apresentar maior número de casos positivos e maior prevalência (Tabela 32 e 33).

De referir que a região do Algarve é reconhecida como oficialmente indemne de tuberculose bovina em gado bovino desde abril de 2012 (Mapa 19).

Tabela 32: Prevalências de exposição aos agentes da Tuberculose nas espécies domésticas

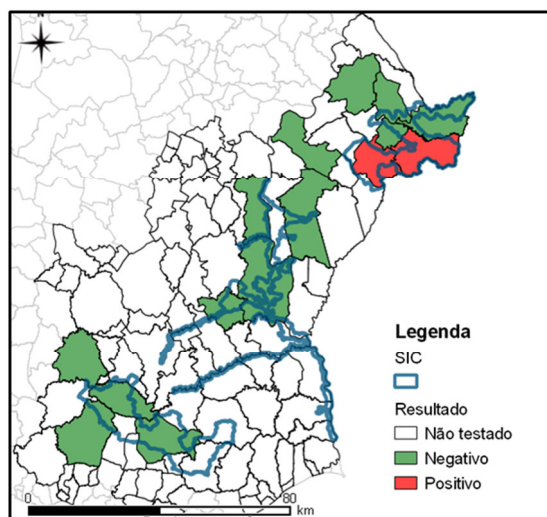
	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 4 - Plano 2013	51448	101	0,196%	0%	0-0%
Grupo 4 - Plano 2012	51120	113	0,221%	0%	0-0%

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

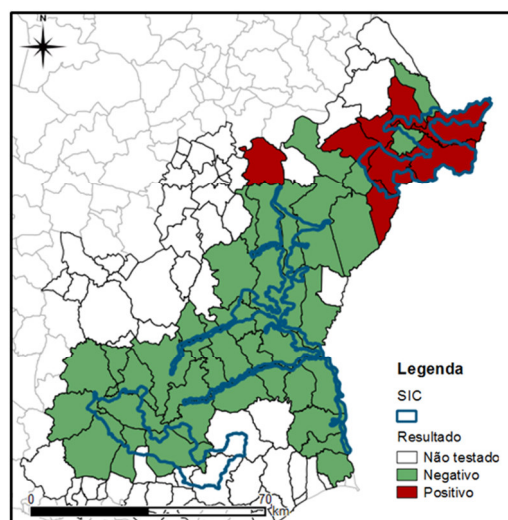
Tabela 33: Prevalências para a presença do agente da Tuberculose nas áreas e grupo dos ungulados domésticos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 4 - Plano 2013	24715	100	0,405%	0%	0-0%	24598	1	0,004%	0%	0-0%	2135	0	0%	0%	0-0%
Grupo 4 - Plano 2012	25342	112	0,442%	0%	0-0%	24478	1	0,004%	0%	0-0%	1300	0	0%	0%	0-0%

T- Testados, P-Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%



Mapa 18: Freguesias testadas para isolamento de bactérias do complexo da Tuberculose em populações selvagens



Mapa 19: Freguesias testadas no âmbito do PEVTB

4.9 Cytauxzoonose (*Cytauxzoon felis*)

Amostras recolhidas de cadáveres de felídeos, soros e zaragatoas foram sujeitas a PCR pelo método de Birkenheuer (2006)¹¹ para deteção da presença de *Cytauxzoon felis* com limite de deteção de 0,01 cópias por mililitro, especificidade de 100% e sensibilidade assumida como 100%.

Tabela 34: Amostragem efetuada para Cytauxzoonose

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	45	27	16	20	20	12	30	16	16
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Trinta e dois felídeos, embora tenham sido amostrados no decurso do projeto, não foram processados pela metodologia descrita (Tabela 34).

¹¹Birkenheuer, A. J.; Marr, H. & Alleman, A.R. (2006). Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. *Vet Parasit* 137(1-2), 144-9.

Tabela 35: Prevalências de exposição ao *Cytauxzoon felis* nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	19	0	0%	0%	0-17,6%
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-

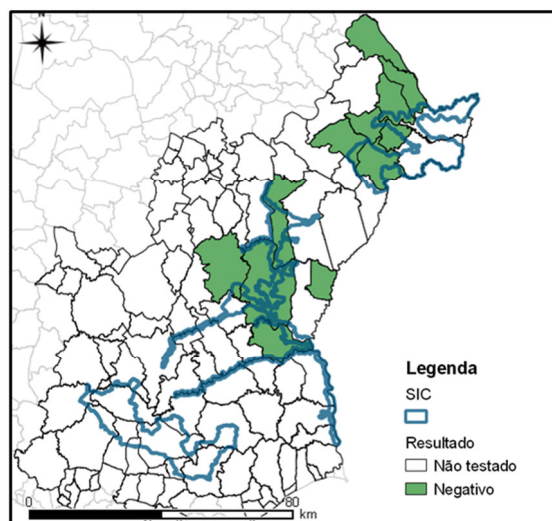
T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tabela 36: Prevalências de exposição ao *Cytauxzoon felis* nas áreas e grupos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	11	0	0%	0%	0-26,5%	8	0	0%	0%	0-36,5%	0	-	-	-	-
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Em nenhum animal, cujas amostras foram testadas para a presença de *Cytauxzoon felis*, foi identificado este agente e, como tal, as prevalências encontradas foram zero, IC=0-17,6% (Tabela 35). Também nenhuma diferença foi identificada como estatisticamente significativa entre as prevalências obtidas por região, $p_{\text{Fisher}}=1$ (Tabela 36).



Mapa 20: Freguesias testadas para a presença de *Cytauxzoon felis*

4.10 Rinotraqueíte felina (FHV)

Amostras de cadáveres e zaragatoas de diferentes mucosas de vários felídeos foram sujeitas a PCR para detecção da presença de Herpesvirus felino-1 (FHV), de acordo com o método descrito por Helps *et al.* (2003)¹², com sensibilidade superior a 95% e especificidade de 98%.

Amostras de três gatos não foram processadas para o estudo desta doença nas populações felinas nas três áreas em consideração (Tabela 37).

Tabela 37: Amostragem efetuada para Rinotraqueíte felina

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	45	43	1	20	19	0	30	30	0
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Tabela 38: Prevalências de exposição ao Herpesvirus felino-1 nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	91	1	1,1%	0%	0-4,2%
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC-Intervalo de confiança 95%

Tabela 39: Prevalências de exposição ao Herpesvirus felino-1 nas áreas e grupos em estudo

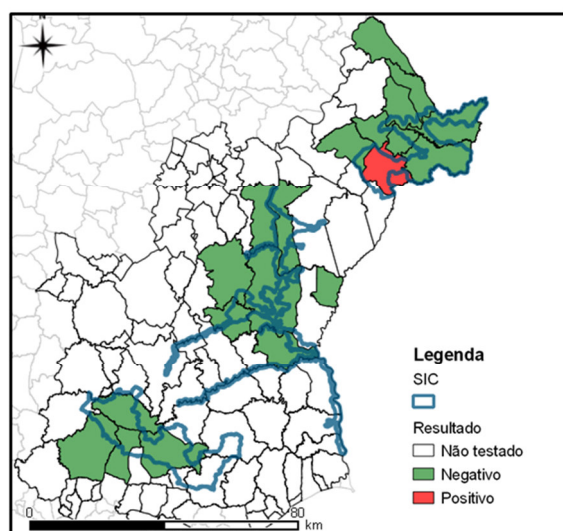
	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	42	1	2,4%	0,4%	0-11,5%	19	0	0%	0%	0-16,7%	30	0	0%	0%	0-9,8%
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Material genético de FHV foi encontrado em apenas um *F. catus* capturado em Sobral de Adiça, na região de Moura-Barrancos, sendo as prevalências calculadas para o total das três regiões, tendo em conta o método usado, da ordem dos 1,1% (Pa), 0% (PR) para 0-4,2% (IC) (Tabela 38).

Diferenças entre as prevalências das diferentes zonas (Tabela 39) não foram consideradas significativas ($p_{\text{Fisher}}=1$).

¹² Helps, C.; Reeves, N.; Egan, K.; Howard, P. & Harbour, D. (2003): Detection of *Chlamydomphila felis* and feline herpesvirus by multiplex real-time PCR analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 7, 2734-2736.



Mapa 21: Freguesias testadas para a presença de FHV

4.11 Leptospirose (*Leptospira interrogans*)

Os grupos 1 a 5 foram amostrados para estudo da prevalência de leptospira ou anticorpos anti-leptospira nas três áreas em análise. Cadáveres, urina, fezes, vários órgãos, soro e zaragatoas foram os tipos de amostras testados por isolamento, cultura ou micro-aglutinação, em concordância com o que está descrito por Rocha (1998)¹³ e OIE(2008)¹⁴.

Não sendo aplicáveis conceitos de sensibilidade e especificidade aos métodos usados, estes foram assumidos como sendo 100%.

No caso da deteção de anticorpos anti-leptospira, considerou-se que resultados positivos, diagnósticos e indicativos de infeção recente ou antiga, seriam todos os títulos que fossem superiores a 1:100 para qualquer um dos serovares encontrados.

Tabela 40: Amostragem efetuada para Leptospirose

		Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Tipo	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	Ac	45	27	6	20	6	0	30	17	1
	I	45	1	1	20	3	0	30	0	0
Grupo 2	Ac	121	121	0	90	80	3	99	65	15
Grupo 3	Ac	94	45	12	22	7	2	32	26	16
	I	94	42	32	22	8	3	32	5	5
Grupo 4	Ac	75	64	1	45	29	10	20	19	3
Grupo 5	Ac	65	12	0	71	24	11	31	0	-
	I	65	20	18	71	21	20	31	9	7
Grupo 6		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Tipo - tipo de teste: determinação da presença de leptospiros (I) ou deteção de anticorpos (Ac)

Nem todos os animais amostrados puderam ser processados para estas metodologias, como são os casos dos grupos 1, 3 e 4 (Tabela 40).

¹³ Rocha, T. (1998) A Review of leptospirosis in farm animals in Portugal. *Office International des Epizooties Scientific and Technical Review*, 17(3), 699-712.

¹⁴ O.I.E. (2008). Office International des Epizooties- World Organization for Animal Health (2008). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.

Tabela 41: Prevalências totais de exposição a *Leptospiras* nas três áreas e grupos em estudo

	Tipo	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	Ac	43	10	23,3%	23,3%	12,4-38,3%
	I	3	0	0%	0%	0-63,2%
Grupo 2	Ac	248	12	4,8%	4,8%	2,7-8,4%
Grupo 3	Ac	48	6	12,5%	12,5%	5,6-24,8%
	I	15	0	0%	0%	0-22,2%
Grupo 4	Ac	98	9	9,2%	9,2%	4,7-16,7%
Grupo 5	Ac	25	0	0%	0%	0-13,4%
	I	5	0	0%	0%	0-50%
Grupo 6		0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tipo - tipo de teste: determinação da presença de leptospiros (I) ou detecção de anticorpos (Ac)

Tabela 42: Prevalências de exposição a *Leptospiras* nas áreas e grupos em estudo

	Moura-Barrancos						Vale do Guadiana						Serra do Caldeirão					
	Tipo	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC		
Grupo 1	Ac	21	7	33,3%	33,3%	15,9-55,1%	6	2	33,3%	33,3%	6,3-72,9%	16	1	6,3%	6,3%	0,3-30,5%		
	I	-	-	-	-	-	3	0	0%	0%	0-63,2%	0	-	-	-	-		
Grupo 2	Ac	121	9	7,4%	7,4%	3,8-13,5%	77	2	2,6%	2,6%	0,5-8,9%	50	1	2%	2%	0,1-10,7%		
Grupo 3	Ac	33	6	18,2%	18,2%	8,2-34,7%	5	0	0%	0%	0-50%	10	0	0%	0%	0-29,1%		
	I	10	0	0%	0%	0-29,1%	5	0	0%	0%	0-50%	0	-	-	-	-		
Grupo 4	Ac	63	7	11,1%	11,1%	5,3-21,3%	19	1	5,3%	5,3%	0,3-25,7%	16	1	6,3%	6,3%	0,3-30,5%		
Grupo 5	Ac	12	0	0%	0%	0-24,3%	13	0	0%	0%	0-22,5%	0	-	-	-	-		
	I	2	0	0%	0%	0-77,6%	1	0	0%	0%	0-73,1%	2	0	0%	0%	0-77,6%		
Grupo 6		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-		

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tipo - tipo de teste: determinação da presença de leptospiros (I) ou detecção de anticorpos (Ac)

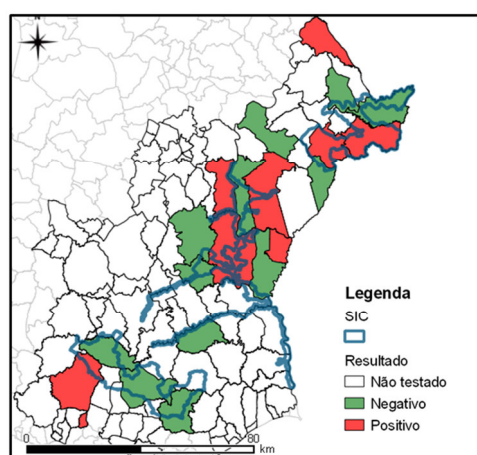
Em nenhuma amostra foi isolada *Leptospira interrogans* (Tabela 41), possivelmente dificuldades no isolamento das espiroquetas por contaminação das amostras ou alterações *post-mortem* poderão ser as razões para a ausência de resultados neste ensaio. Contudo anticorpos anti-leptospira foram detetados acima de 1:100 em 41 animais dos grupos 1 a 4, o que poderá indicar exposição a este agente infeccioso nestas áreas. No entanto, no grupo 2 é prática comum em algumas matilhas fazer vacinação contra esta doença e poderão ter sido detetados anticorpos vacinais com este método. As diferenças entre prevalências aqui reunidas entre regiões (Tabela 42) não foram consideradas significativas ($p_{\text{Fisher}} > 0,1$).

Dos animais em cujas amostras foram detetados anticorpos contra este agente infeccioso, em apenas 2 animais foram identificados anticorpos contra apenas um serovar específico em título considerado positivo, sendo as combinações de mais de dois serovares as mais frequentemente encontradas, impossibilitando a determinação de serovares infetantes. Em 40,5% das amostras de animais positivos a anticorpos anti-leptospira, anticorpos de outros serovares, em títulos menores, foram também registados (tabela 43). Outra situação a considerar é a de 30 casos, pertencentes aos

grupos 1 a 4, em que, embora não apresentassem títulos considerados positivos, nas suas amostras foram quantificados anticorpos contra este agente indicando simplesmente possível exposição prévia sem qualquer tipo de consequências ou situações de cronicidade de infeção.

Tabela 43: Serovares identificados

Espécie	Títulos $\geq 1:100$	Títulos $< 1:100$
<i>Felis catus</i>	Pomona, Mozdok, Grippotyphosa	Pomona, Mozdok, Grippotyphosa
<i>Canis familiaris</i>	Pomona, Mozdok, Grippotyphosa, Bratislava	Pomona, Mozdok, Grippotyphosa, Bratislava, Icterohaemorrhagiae
<i>Vulpes vulpes</i>	Pomona, Mozdok, Grippotyphosa	Pomona, Mozdok, Grippotyphosa
<i>Herpestes ichneumon</i>	Pomona, Mozdok	Pomona, Mozdok, Grippotyphosa
<i>Sus scrofa</i>	Pomona, Mozdok, Bratislava	Pomona
<i>Cervus elaphus</i>	Pomona, Mozdok, Bratislava, Autumnalis	Pomona, Mozdok, Bratislava, Autumnalis



Mapa 22: Freguesias testadas para isolamento de leptospiros ou presença de anticorpos anti-leptospira

4.12 Brucelose (*Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*)

Na análise da Brucelose, quatro grupos foram testados para a presença de anticorpos ou agente patogénico. Amostras de soro, cadáveres e órgãos recolhidos em montarias foram sujeitos a vários tipos de ensaios. A pesquisa de anticorpos foi feita por três métodos, frequentemente em série: Rosa Bengala (PE-001-BAC/BR, 2012-08-02, Anexo C da Diretiva 64/432/CEE e suas alterações), com sensibilidade e especificidade de 100%; Fixação de Complemento com sensibilidade e especificidade de 92% e 100%, respetivamente (PE-002-BAC/BR, 2012-08-02, Anexo C da Diretiva 64/432/CEE e suas alterações) e Imunocromatografia de anticorpos anti-*Brucella canis* (kit da BIONOTE, sensibilidade e especificidade assumidas como 100%). Relativamente a este último método, por vezes, em sua substituição, a aglutinação rápida em lâmina, ou mesmo lenta, foi antes tentada em algumas amostras de soro (testagens paralelas

também foram efetuadas com estes dois métodos) com sensibilidades e especificidades assumidas como 100%. Por sua vez, a presença do agente foi registada por isolamento, por método cultural, com exceção das espécies *B. ovis* e *B. canis* (PE-010-BAC/BR, 2012-03-09), com sensibilidade e especificidade assumidas como 100%, dada a indisponibilidade destes valores (Tabela 44).

Tabela 44: Amostragem efetuada para Brucelose

		Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	tec	Proc.	Prej.	ACC	Proc.	Prej.	ACC	Proc.	Prej.	ACC
Grupo 1	Is	2	1	na	3	0	Na	0	-	na
Grupo 2	RB	121	23	na	89	12	Na	99	40	na
	FC	120	21	7	90	4	18	99	17	6
	Im	45	24	na	65	3	Na	10	2	na
	RL	76	76	na	10	10	Na	73	35	na
	LL	13	0	na	0	-	Na	0	-	na
Grupo 3	RB	23	11	na	4	0	Na	23	10	na
	FC	23	2	0	4	0	0	23	4	0
	Im	1	0	na	0	-	Na	0	-	na
	RL	20	14	na	4	3	Na	20	16	na
	LL	2	2	na	0	-	Na	1	1	na
	Is	30	7	na	10	3	Na	2	1	na
Grupo 4	RB	64	5	na	36	13	Na	19	7	na
	FC	63	4	4	36	15	2	19	6	0
	Is	18	0	na	38	0	Na	19	0	na
Grupo 5		-	-		-	-		-	-	-
Grupo 6		-	-		-	-		-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

ACC- Atividade anti-complemento

na- não aplicável

tec - técnica usada: Rosa-Bengala (RB), Fixação do Complemento (FC), Imunocromatografia (Im), Aglutinação rápida em lâmina (RL), Aglutinação lenta em lâmina (LL), Isolamento cultural (Is)

Tabela 45: Prevalências de exposição a *Brucella* sp. nos grupos e no total das três áreas

	Tec	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	Is	4	0	0%	0%	0-52,7%
Grupo 2	RB	234	12	5,1%	5,1%	2,9-8,7%
	FC	236	3	1,3%	1,4%	0,4-4,1%
	Im	91	0	0%	0%	0-4,1%
	RL	38	0	0%	0%	0-8,8%
	LL	13	4	30,8%	30,8%	11,3-58,7%
Grupo 3	RB	29	0	0%	0%	0-11,5%
	FC	44	0	0%	0%	0-9,3%
	Im	1	0	0%	0%	0-73,1%
	RL	11	0	0%	0%	0-26,5%
	LL	0	-	-	-	-
	Is	31	0	0%	0%	0-10,8%
Grupo 4	RB	94	10	10,6%	10,6%	5,7-18,5%
	FC	87	9	10,3%	11,2%	5,8-20,5%
	Is	75	0	0%	0%	0-5%
Grupo 5		0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

tec - técnica usada: Rosa-Bengala (RB), Fixação do Complemento (FC), Imunocromatografia (Im), Aglutinação rápida em lâmina (RL), Aglutinação lenta em lâmina (LL), Isolamento cultural (Is).

Tabela 46: Prevalências de exposição a *Brucella* sp. nas áreas e grupos em estudo

	Moura-Barrancos						Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	Tec	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	Is	1	0	0%	0%	0-73,1%	3	0	0%	0%	0-63,2%	0	-	-	-	-
Grupo 2	RB	98	12	12,2%	12,2%	7-20,3%	77	0	0%	0%	0-4,9%	59	0	0%	0%	0-6,4%
	FC	92	3	3,3%	3,5%	1-9,9%	68	0	0%	0%	0-6%	76	0	0%	0%	0-5,4%
	Im	21	0	0%	0%	0-15,9%	62	0	0%	0%	0-6,1%	8	0	0%	0%	0-36,5%
	RL	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	38	0	0%	0%	0-8,8%
	LL	13	4	30,8%	30,8%	11,3-58,7%	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	RB	12	0	0%	0%	0-24,3%	4	0	0%	0%	0-52,7%	13	0	0%	0%	0-22,5%
	FC	21	0	0%	0%	0-17,3%	4	0	0%	0%	0-57,3%	19	0	0%	0%	0-19,1%
	Im	1	0	0%	0%	0-73,1%	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	RL	6	0	0%	0%	0-41,1%	1	0	0%	0%	0-73,1%	4	0	0%	0%	0-52,7%
	LL	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4	Is	23	0	0%	0%	0-14,5%	7	0	0%	0%	0-37,7%	1	0	0%	0%	0-73,1%
	RB	59	5	8,5%	8,5%	3,4-18,5%	23	4	17,4%	17,4%	6,2-38,9%	12	1	8,3%	8,3%	0,4-37%
	FC	55	2	3,6%	4%	0,7-13,5%	19	5	26,3%	28,6%	11,9-54,3%	13	2	15,4%	16,7%	3-47,2%
Grupo 5	Is	18	0	0%	0%	0-18,5%	38	0	0%	0%	0-8,8%	19	0	0%	0%	0-17,6%
		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%
tec - técnica usada: Rosa-Bengala (RB), Fixação do Complemento (FC), Imunocromatografia (Im), Aglutinação rápida em lâmina (RL), Aglutinação lenta em lâmina (LL), Isolamento cultural (Is).

Dos vários animais processados pelas metodologias descritas e para os quais um resultado válido foi obtido, apenas nos grupos 2 e 4 foram encontrados resultados positivos que indicam exposição ou infecção (Tabela 45 e 46). Em nenhuma amostra para cultura, foram isolados microrganismos do género *Brucella*, mas nestes 2 grupos as metodologias serológicas possibilitaram a identificação de animais positivos. No grupo 2, estes concentraram-se na área de Moura-Barrancos, enquanto no grupo 4 provieram das três áreas em estudo de espécies como *Sus scrofa* (n=6 para RB e n=9 para FC), *Cervus elaphus* (n=3 para RB) e *Dama dama* (n=1 para RB). Foi também nestes dois grupos que foram encontradas diferenças significativas entre as prevalências das várias regiões: $p_{\text{Fisher}}=0,04633$ no grupo dos canídeos para o método do Rosa-Bengala e $p_{\text{Fisher}}=0,0113$ no grupo 4 para Fixação de Complemento, possivelmente indicando que para o grupo 2 a região com maior prevalência será Moura-Barrancos e no caso do grupo 4 o Vale do Guadiana.

Considerando os dados do Programa de Erradicação e Vigilância da Brucelose Bovina (PEVBB) e do Programa de Erradicação da Brucelose dos Pequenos Ruminantes (PEBPR), a prevalência destes agentes em animais domésticos foi, em 2012, de 0,180% (PR=0,180%, IC=0,159-0,204%), enquanto que em 2013 foi de 0,041%, PR=0,041%, IC=0,032-0,053%, (Tabela 47). Quando comparadas as prevalências das três áreas, para cada ano, foram encontradas diferenças consideradas significativas (2013: $\chi^2=188,9981$; g.l.=2; $p<0,05$; 2012: $\chi^2=1295,008$; g.l.=2; $p<0,05$), estando a região da Serra do Caldeirão a apresentar maior prevalência (Tabela 48).

De referir que a região do Algarve é reconhecida como oficialmente indemne de Brucelose Bovina (*B. abortus*) desde abril de 2012, embora não o seja para a Brucelose dos pequenos ruminantes (*B. melitensis*) (Mapas 24-25).

Tabela 47: Prevalências de exposição a *Brucella* sp. em espécies domésticas

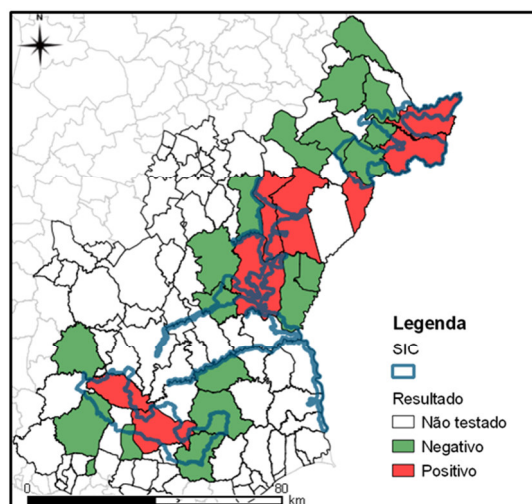
	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 4 - Planos 2013	150322	62	0,041%	0,041%	0,032-0,053%
Grupo 4 - Planos 2012	149920	270	0,180%	0,180%	0,159-0,204%

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

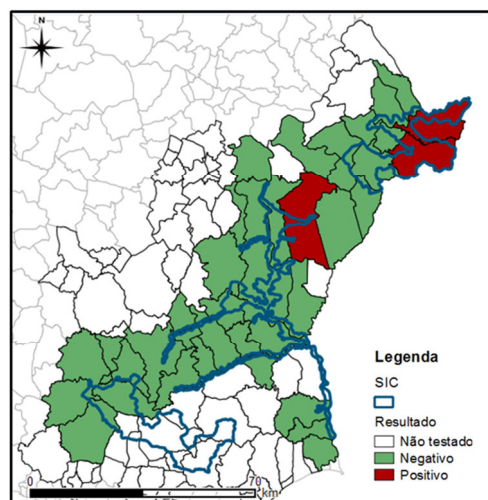
Tabela 48: Prevalências para presença do agente da Brucelose nas áreas e grupos dos ungulados domésticos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 4 - Planos 2013	41343	3	0,007%	0,007%	0,002-0,022%	88102	13	0,015%	0,015%	0,008-0,026%	20877	46	0,22%	0,22%	0,162-0,296%
Grupo 4 - Planos 2012	42770	2	0,005%	0,005%	0,001-0,017%	85774	23	0,027%	0,027%	0,017-0,041%	21376	245	1,146%	1,146%	1,007-1,302%

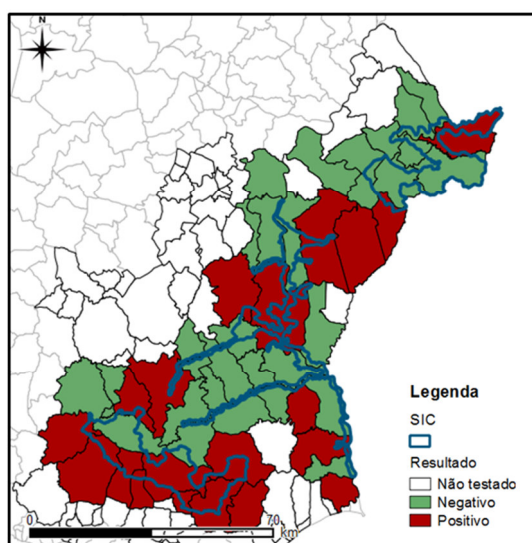
T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%



Mapa 23: Freguesias testadas para a presença de bactérias do género *Brucella* e/ou anticorpos



Mapa 24: Freguesias testadas no âmbito do PEVBB



Mapa 25: Freguesias testadas no âmbito do PEBPR

4.13 Pasteurelose (*Pasteurella haemolytica*)

Amostras de vários grupos em estudo foram usadas para isolamento e identificação de agentes patogênicos nomeadamente *Pasteurella haemolytica* em soros, zaragatoas, fezes, urina, órgãos e cadáveres, por método cultural interno, assumindo uma sensibilidade e especificidade de 100%.

Tabela 49: Amostragem efetuada para *Pasteurella sp*

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	94	36	24	22	6	2	32	4	3
Grupo 4	75	18	0	45	0	0	20	10	0
Grupo 5	65	41	37	71	44	22	31	29	29
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Duzentos e sessenta e sete animais, amostrados para as três áreas em estudo, não foram processados para o estudo desta doença (Tabela 49).

Tabela 50: Prevalências para isolamento de *Pasteurella sp.* nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	0	-	-	-	-
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	17	0	0%	0%	0-19,6%
Grupo 4	28	0	0%	0%	0-11,9%
Grupo 5	26	0	0%	0%	0-12,9%
Grupo 6	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

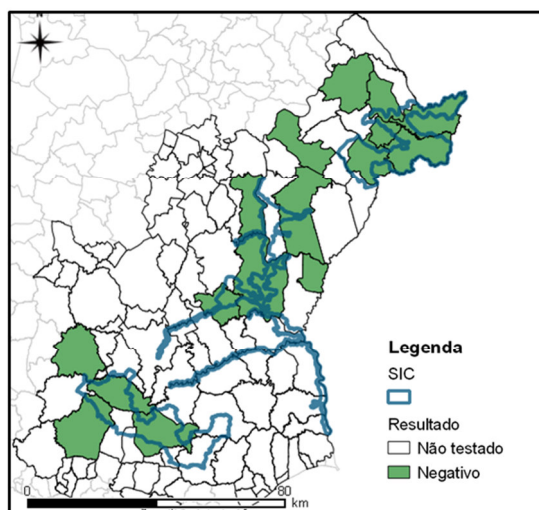
Tabela 51: Prevalências para isolamento de *Pasteurella sp.* nas áreas e grupos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	12	0	0%	0%	0-24,3%	4	0	0%	0%	0-52,7%	1	0	0%	0%	0-73,1%
Grupo 4	18	0	0%	0%	0-18,5%	0	-	-	-	-	10	0	0%	0%	0-29,1%
Grupo 5	4	0	0%	0%	0-52,7%	22	0	0%	0%	0-15,2%	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Em nenhuma das amostras testadas foram identificadas bactérias patogênicas, nomeadamente *Pasteurella haemolytica* (Tabela 50 e 51).

As prevalências totais foram de 0%, entre 0-19,6% para o grupo 3, 0-11,9% para o grupo 4 e 0-12,9% para o grupo 5 e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as prevalências calculadas na análise desta doença ($p_{\text{Fisher}}=1$).



Mapa 26: Freguesias testadas para isolamento de *Pasteurella Haemolytica*

4.14 Clamidiose (*Chlamydomphila felis*)

Amostras em zaragatoas e cadáveres de felídeos foram testadas para a presença de material genético de *Chlamydomphila felis* por PCR-REA descrito por Ossewaarde e Meijer (1999)¹⁵, assumindo uma sensibilidade e especificidade de 100%.

Tabela 52: Amostragem efetuada para Clamidiose felina

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	45	27	1	20	15	0	30	27	0
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Novamente nem todos os indivíduos amostrados foram analisados (Tabela 52).

Tabela 53: Prevalências de exposição a *Chlamydomphila felis* nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	68	0	0%	0%	0-5,5%
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

¹⁵Ossewaarde, J. M. & Meijer, A. (1999). Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales. *Microbiology*, 145 (part 2), 411-7.

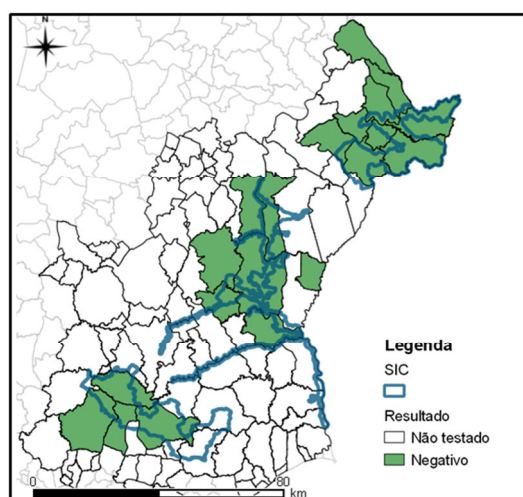
Tabela 54: Prevalências de exposição a *Chlamydomydia felis* nas áreas e grupos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	26	0	0%	0%	0-12,9%	15	0	0%	0%	0-22,2%	27	0	0%	0%	0-12,4%
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Em nenhum dos animais testados para a presença deste agente patogénico foi encontrada *Chlamydomydia felis* (Tabela 53).

A prevalência para este grupo para as três regiões é de 0% (PR=0%, IC=0-5,5%) e também não parecem existir diferenças significativas entre as prevalências de Moura-Barrancos, Vale do Guadiana e Serra do Caldeirão, Tabela 54 ($p_{\text{Fisher}}=1$).



Mapa 27: Freguesias testadas para presença de material genético da Clamidiose

4.15 Tularémia (*Francisella tularensis*)

Amostras de soro, fezes e zaragatoas recolhidas em lagomorfos e roedores foram sujeitas a extração pelo robô easymag da bioMerieux para deteção de material genético deste agente por PCR em tempo real (LightCycler, Roche) por amplificação combinada de *tul4* e *ISFtu2*. Dada a alta especificidade garantida pelo uso de dois primers, de uma sonda específica e a especificidade do alvo *tul4* para a *F. tularensis*, considerou-se que esta seria de 100%. Relativamente à sensibilidade e dado que o uso do alvo *ISFtu2* em combinação com o anterior poderá garantir uma sensibilidade máxima para o ensaio, quando comparado com outras técnicas como a cultura, este parâmetro também foi considerado como 100%. Outro método usado foi o PCR simples de *tul4*, para o qual a sensibilidade e especificidade foram consideradas como sendo 62% e 100%, respetivamente quando comparadas com cultura¹⁶.

¹⁶Johansson, A.; Berglund, L.; Eriksson, U.; Goransson, I.; Wolin, R. & Forsman, M. (2000). Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J Clin Microbiol*, 38: 22–6.

Tabela 55: Amostragem efetuada para Tularémia

		Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	tec	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 2		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 4		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	real	65	49	0	71	67	0	31	29	0
	conv	65	13	0	71	3	0	31	0	-
Grupo 6		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

tec - técnica usada: Real time PCR (real) ou PCR convencional (conv)

Em amostras de 10 dos animais testados, foram efetuados ensaios em paralelo com PCR convencional para o alvo *tul4* com resultado concordante com o método anteriormente descrito e em seis foi tentado unicamente este último procedimento (Tabela 55).

Nenhum resultado positivo foi encontrado com este procedimento. Contudo o tipo de amostras disponíveis poderá não ter sido o ideal, dado que amostras de órgãos são indicadas como as melhores para a deteção deste agente com estas técnicas. Também poderão ter ocorrido situações em que elevadas taxas de letalidade não permitiram o encontrar de animais doentes ou aqueles cujas amostras seriam positivas para estes ensaios (Tabela 56), pelo que os resultados obtidos poderão ser ou não considerados preocupantes.

Tabela 56: Prevalências de exposição a *Francisella tularensis* nos grupos em estudo

	tec	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1		0	-	-	-	-
Grupo 2		0	-	-	-	-
Grupo 3		0	-	-	-	-
Grupo 4		0	-	-	-	-
Grupo 5	real	145	0	0%	0%	0-2,6%
	conv	16	0	0%	0%	0-33,6%
Grupo 6		0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

tec - técnica usada: real time PCR (real) ou PCR convencional (conv)

Tabela 57: Prevalências de exposição a *Francisella tularensis* nas áreas e grupos em estudo

		Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	tec	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 2		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5	real	49	0	0%	0%	0-7,7%	67	0	0%	0%	0-5,6%	29	0	0%	0%	0-11,5%
	conv	13	0	0%	0%	0-36,3%	3	0	0%	0%	0-100%	0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

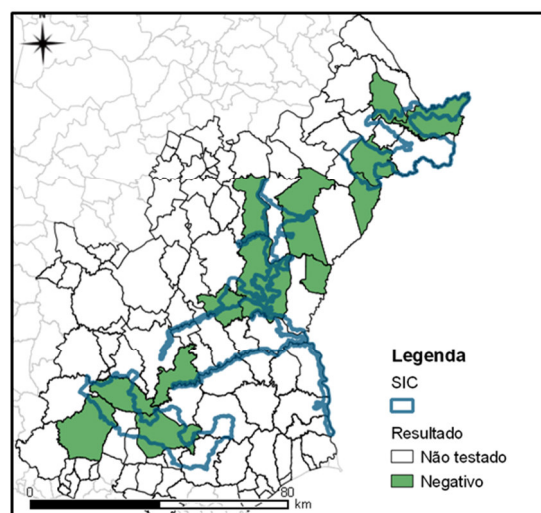
tec - técnica usada: Real time PCR (real) ou PCR convencional (conv)

Karhukorpi, E. K. & Karhukorpi, J. (2001). Rapid laboratory diagnosis of ulceroglandular tularemia with polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis*, 33(5), 383-5.

Versage, J. L.; Severin, D. D.; Chu, M. C. & Petersen, J. M. (2003). Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol*, 41(12), 5492-9.

Vogler, A.J.; Birdsell, D.; Wagner, D.M. & Keim, P. (2009). An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *LetApplMicrobiol*, 48(1), 140-144.

A prevalência para o método combinado para a totalidade das zonas em estudo foi de 0% (PR=0%, IC=0-2,6%), enquanto que pelo método convencional esta também foi de 0%, sendo possivelmente a PR igualmente de 0%, IC 0-33,6% (Tabela 56). Relativamente a diferenças de prevalência entre as áreas em estudo, dada a semelhança de prevalências (Tabela 57), não existem de facto diferenças significativas entre estas regiões quando considerados os dois métodos ($p_{\text{Fisher}}=1$, para ambas).



Mapa 28: Freguesias testadas para a presença deste agente infeccioso

4.16 Coccidiose (Família *Eimeriidae*)

Zaragatoas rectais, fezes e conteúdo intestinal de cadáveres foram recolhidos dos vários grupos em análise para esta doença, para estudo parasitológico com a intenção de pesquisar a presença de protozoários, nomeadamente Coccídeos segundo a técnica de Willis, mas como procedimento interno. Dada a grande variabilidade na sensibilidade do método de diagnóstico usado assumiu-se esta como sendo 100%, valor que igualmente corresponde à sua especificidade.

Tabela 58: Amostragem efetuada para Coccidiose

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	94	1	0	22	0	-	32	1	0
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	65	62	23	71	68	26	31	30	1
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Cento e cinquenta e três animais amostrados nas regiões em estudo não foram processados para esta doença (Tabela 58).

Tabela 59: Prevalências para a presença de Coccídeas em amostras dos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	0	-	-	-	-
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	2	0	0%	0%	0-77,6%
Grupo 4	0	-	-	-	-
Grupo 5	110	14	12,7%	12,7%	7,6-20,4%
Grupo 6	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

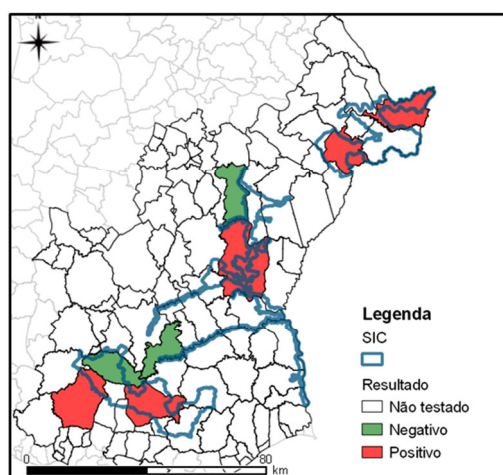
Tabela 60: Prevalências para a presença de Coccídeas nas amostras processadas por áreas e grupos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	1	0	0%	0%	0-73,1%	0	-	-	-	-	1	0	0%	0%	0-73,1%
Grupo 4	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5	39	4	10,3%	10,3%	3,6-24,1%	42	6	14,3%	14,3%	6,4-28,4%	29	4	13,8%	13,8%	4,9-30,8%
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Poucos resultados foram obtidos para o grupo 3 (Tabela 59), visto que poucos foram processados e sendo provavelmente mais difícil recolher o tipo de amostras ideal para este estudo neste grupo do que em lagomorfos e roedores que, por exemplo, raramente foram recolhidos enquanto cadáveres. Relativamente ao grupo 5, apenas foram identificados oocistos da família *Eimeriidae* em 14 espécimes (13 *Mus spretus* e 1 *Apodemus sylvaticus*).

A prevalência aparente calculada para o grupo 3 foi de 0% (PR=0%, IC=0-77,6%) enquanto no caso do grupo 5 esta foi de 12,7% (PR=12,7, IC=7,6-20,4%) e apesar de prevalências entre as várias regiões serem muito semelhantes (Tabela 60), não foram encontradas diferenças significativas entre elas (para ambas $p_{\text{Fisher}}=1$).



Mapa 29: Freguesias testadas para a presença deste grupo de parasitas

4.17 Toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*)

Amostras de soro, cadáveres e zaragatoas foram recolhidas e submetidas a aglutinação direta com o *kit* Toxo-Screen DA da bioMérieux de forma a detetar a presença de anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, com possivelmente especificidade de 98,80% e sensibilidade de 96,22% (valores para soros humanos).

Tabela 61: Amostragem efetuada para Toxoplasmose

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	45	44	1	20	19	1	30	30	0
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	65	60	37	71	65	41	31	14	13
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Trinta animais amostrados nestas 3 áreas não foram processados para a análise desta doença (Tabela 61).

Tabela 62: Prevalências de exposição a *Toxoplasma gondii* nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	91	40	44%	45%	34,5-56%
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-
Grupo 5	48	2	4,2%	3,1%	0-13,7%
Grupo 6	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

O agente desta doença não pôde ser identificado em nenhuma das amostras processadas, mas indícios de exposição foram encontrados em felídeos e em dois coelhos bravos. Os títulos obtidos no grupo 1 variaram desde 1:40 a 1:16200, enquanto títulos de apenas 1:40 foram os únicos quantificados no grupo 5 (indivíduos caçados em São João dos Caldeireiros em Mértola, Vale do Guadiana).

Tabela 63: Prevalências de exposição a *Toxoplasma gondii* nas áreas e grupos em estudo

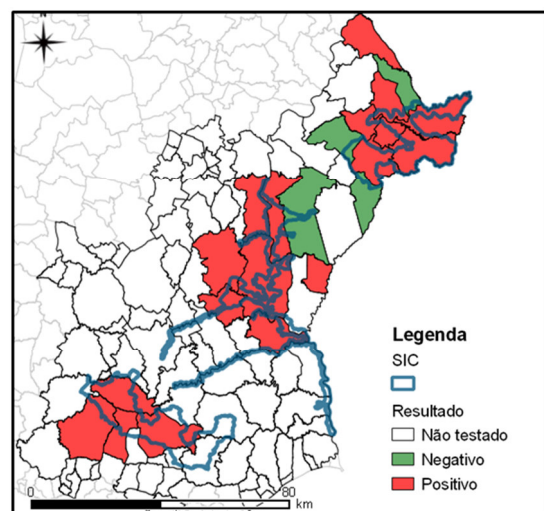
	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	43	15	34,9%	35,4%	21,7-51,4%	18	15	83,3%	86,4%	60,4-99%	30	10	33,3%	33,8%	17,4-53,1%
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5	23	0	0%	0%	0-14%	24	2	8,3%	7,5%	0,3-26,8%	1	0	0%	0%	0-75,7%
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

No grupo 1, amostras de 33 *F. catus*, 3 *F. silvestris* e 4 *Felis sp.* foram positivas para a deteção de anticorpos e a região do Vale do Guadiana é a que parece apresentar maior prevalência. De facto, esta zona é provavelmente a que possui a maior

prevalência (Tabela 63), uma vez que as diferenças encontradas entre estas foram consideradas significativas ($\chi^2=14,1405$; g.l=2; $p=0,00085$).

No caso do grupo 5 não foram encontradas diferenças significativas entre regiões ($p_{\text{Fisher}}=0,5106$).



Mapa 30: Freguesias testadas para exposição a *Toxoplasma gondii*

4.18 Leishmaniose (*Leishmania infantum*)

Amostras de soro foram recolhidas para deteção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* por imunofluorescência indireta (método interno) com sensibilidade e especificidade de 96% e 98% respetivamente (no que respeita a soros de cão). As restantes amostras foram sujeitas a PCR, segundo a metodologia descrita por Cortes et al. (2004)¹⁷, com especificidade e sensibilidade assumidas como 100%.

Tabela 64: Amostragem efetuada para Leishmaniose

		Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Tipo	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	p	45	4	4	20	2	2	30	0	-
Grupo 2	Ac	121	121	20	90	90	0	99	99	0
Grupo 3	Ac	94	46	40	22	8	8	32	27	26
	p	94	86	61	22	17	9	32	25	24
Grupo 4		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Tipo - tipo de teste: determinação da presença do parasita (p) ou deteção de anticorpos (Ac)

Em 68 animais do grupo 3, foram feitos ensaios em paralelo com estes dois tipos de teste, contudo em sete carnívoros selvagens nenhuma amostra foi processada para a

¹⁷ Cortes, S.; Rolão, N. Ramada, J. & Campino, L. (2004): PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani*.- specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 12-17.

análise deste agente nas populações animais das áreas em estudo do projeto (Tabela 64).

Tabela 65: Prevalências de exposição a *Leishmania infantum* nos grupos em estudo

	Tipo	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	p	0	-	-	-	-
Grupo 2	Ac	290	99	34,1%	34,2%	28,5-40,2%
Grupo 3	Ac	7	0	0%	0%	0-38%
	p	34	0	0%	0%	0-9,8%
Grupo 4		0	-	-	-	-
Grupo 5		0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tipo - tipo de teste: determinação da presença do parasita (p) ou detecção de anticorpos (Ac)

Foram identificados resultados positivos por imunofluorescência indireta apenas em soros de espécimes do grupo 2 (Tabela 65). É necessário salientar que alguns destes indivíduos foram vacinados contra este agente patogênico, pelo que, possivelmente, alguns dos resultados positivos poderão indicar apenas cobertura vacinal e não propriamente uma exposição natural ao parasita nestas áreas.

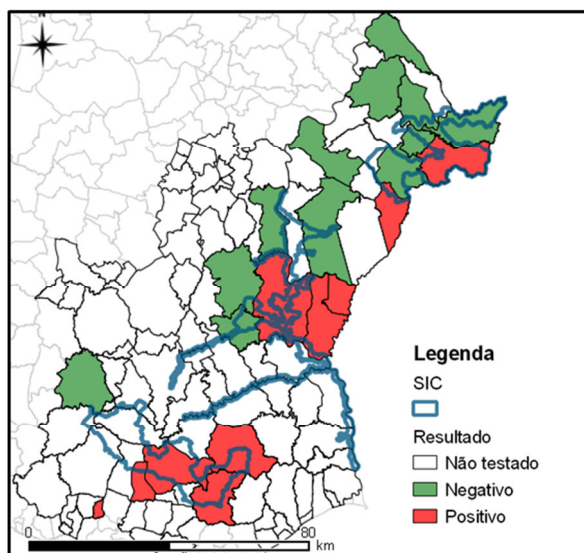
Tabela 66: Prevalências de exposição a *Leishmania infantum* nas áreas e grupos em estudo

Moura-Barrancos							Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	Tipo	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	P	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 2	Ac	101	25	24,8%	24,2%	16,3-34,2%	90	35	38,9%	39,2%	29,1-50,5%	99	39	39,4%	39,8%	30-50,5%
Grupo 3	Ac	6	0	0%	0%	0-41,6%	0	-	-	-	-	1	0	0%	0%	0-75,6%
	P	25	0	0%	0%	0-13,4%	8	0	0%	0%	0-36,4%	1	0	0%	0%	0-73,1%
Grupo 4		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 5		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6		0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T-Testados, P-Positivos, Pa-Prevalência aparente, PR-Prevalência real, IC-Intervalo de confiança 95%

Tipo - tipo de teste: determinação da presença do parasita (p) ou detecção de anticorpos (Ac)

Foram encontradas diferenças significativas entre as três áreas apenas entre as prevalências calculadas para o grupo 2 ($\chi^2=6,0768$, g.l.=2, $p=0,04791$), estando possivelmente a região de Moura-Barrancos a apresentar menor seroprevalência (Tabela 66).



Mapa 31: Freguesias testadas para a presença ou exposição a este hemoparasita

4.19 Riquetsioses e Piroplasmoses (*Anaplasma sp.*, *Ehrlichia sp.*, *Babesia sp.*, *Theileria sp.*)

Carraças recolhidas da vegetação e de alguns dos animais amostrados foram identificadas quanto à sua espécie (cf. Tabela 4: Espécies amostradas no decurso do Projeto) por características fenotípicas e posteriormente processadas de acordo com as indicações do *kit* Qiamp tissue da Quiagen.

A técnica usada para a deteção de material genético destes agentes e de *Coxiella burnetii* (agente que não consta na listagem de doenças) foi PCR simples ou *nested* em concordância com as metodologias de Lorenz *et al.* (1997), Olmeda *et al.* (1997), Inokuma *et al.* (2000) e Harrus *et al.* (2011)¹⁸. Assumiu-se que a sensibilidade e especificidade de todos estes métodos é 100%.

O rastreio molecular para pesquisa destes agentes patogénicos, neste momento, ainda só foi realizado em 73 exemplares recolhidos da vegetação em Mértola, Moura e Serpa. Futuramente as restantes amostras serão processadas e os resultados estarão disponíveis para cálculo de prevalências totais e regionais.

Do entretanto disponibilizado, sabe-se que *Coxiella burnetii* foi identificada em 19 das 60 *H. lusitanicum* testadas (PR=26%, IC=16,9-37,6%), provenientes tanto de Mértola como de Serpa. Foi ainda identificado *Anaplasma marginale* numa *H. lusitanicum*

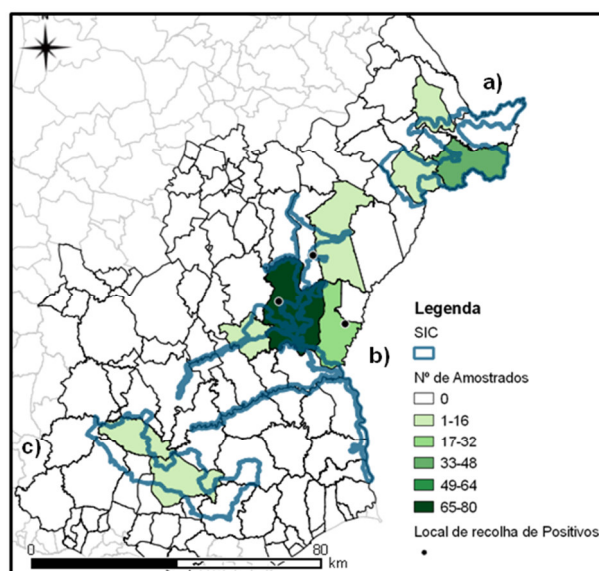
¹⁸ Inokuma, H.; Raoult, D. & Brouqui, P. (2000). Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J Clin Microbiol*, 38(11), 4219-21.

Olmeda, A. S.; Armstrong, P. M.; Rosenthal, B. M.; Valladares, B.; del Castillo, A.; de Armas, F.; Miguelez, M.; Gonzalez, A.; Rodriguez, J. A.; Spielman, A. & Telford S.R. (1997). A subtropical case of human babesiosis. *Acta Trop*, 67, 229-234.

Lorenz, H.; Jäger, C.; Willems, H. & Baljer, G. (1998). PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. *Appl Environ Microbiol*, 64(11), 4234-7.

Harrus, S.; Perlman-Avrahami, A.; Mumcuoglu, K.; Morick, D.; Eyal, O. & Baneth, G. (2011). Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clin. Microbiol. Infect.*, 17, 459-463.

colhida em Serpa (PR=1,4%, IC=0,07-7,3%). Um endosimbionte semelhante a *Ehrlichia* sp. (*Candidatus midichloria mitochondrii*) foi encontrado em *H. lusitanicum* (1,4%, IC=0,07-7,3%) e microrganismos semelhantes a piroplasmas, ainda por identificar, foram também detetados em nove *H. lusitanicum* e 2 *D. marginatus* recolhidos em Moura e Mértola.



Mapa 32: Distribuição por freguesia dos vetores amostrados e locais de origem dos positivos aos ensaios em análise
a) Moura-Barrancos, b) Vale do Guadiana, c) Serra do Caldeirão

4.20 Paratuberculose (*Mycobacterium paratuberculosis*)

Amostras foram submetidas a ensaio serológico por ELISA (kit PARACHEK da TRASCO) para deteção da presença de anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis*. Assumiu-se 100% como valores de especificidade e sensibilidade, dada a ausência de informação sobre os mesmos no produto usado ou valores equiparáveis nas mesmas condições.

Tabela 67: Amostragem efetuada para Paratuberculose

	Moura-Barrancos			Vale do Guadiana			Serra do Caldeirão		
	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.	Amostr.	Proc.	Prej.
Grupo 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 4	75	65	1	45	21	0	20	13	0
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amostr.- Amostrados, Proc.- Processados, Prej.- Prejudicados

Quarenta e um animais do grupo 4 não foram processados para esta doença (Tabela 67).

Tabela 68: Prevalências de anticorpos anti-*M. paratuberculosis* nos grupos em estudo

	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	0	-	-	-	-
Grupo 2	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-
Grupo 4	98	0	0%	0%	0-3,8%
Grupo 5	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-

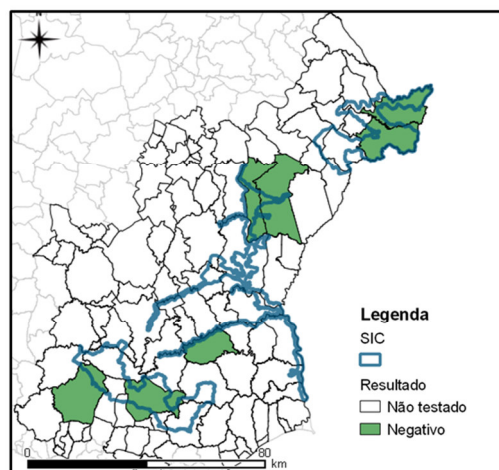
T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Tabela 69: Prevalências de anticorpos anti-*M. paratuberculosis* nas áreas e grupos em estudo

	Moura-Barrancos					Vale do Guadiana					Serra do Caldeirão				
	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC	T	P	Pa	PR	IC
Grupo 1	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 3	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 4	64	0	0%	0%	0-5,9%	21	0	0%	0%	0-15,9%	13	0	0%	0%	0-22,5%
Grupo 5	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Grupo 6	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

T- Testados, P- Positivos, Pa- Prevalência aparente, PR- Prevalência real, IC- Intervalo de confiança 95%

Nenhum soro testado continha anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* (Tabela 68). A seroprevalência para o grupo 4 no total das áreas amostradas foi de 0% (IC=0-3,8%) e nenhuma diferença entre prevalências (Tabela 69) foi considerada significativa ($p_{\text{Fisher}}=1$).



Mapa 33: Freguesias testadas para o agente da Paratuberculose

5 Discussão

5.1 Considerações metodológicas

Este estudo destaca-se pelo número elevado de doenças e espécies abrangidas e por se localizar unicamente em áreas de ocorrência histórica e potencial reintrodução de lince ibérico, tendo sempre em vista o risco potencial para esta espécie e a perspectiva da sua reintrodução.

Embora a necessidade de um estudo com estas características já tivesse sido anteriormente apontada em outros trabalhos, como o de Duarte *et al.* (2012)¹⁹, a informação até agora existente é escassa ou encontra-se dispersa e de difícil obtenção.

Adicionalmente, alguns constrangimentos ou condicionalismos que foram sentidos ao longo deste estudo e já referidos no decurso deste relatório, tornam difícil concretizar alguns dos principais objetivos deste estudo.

Com efeito, como em qualquer outro estudo realizado em fauna selvagem, algumas limitações são recorrentemente encontradas e dificultam a análise completa e objetiva do estado sanitário das populações destas populações, salientando-se as seguintes:

- Raramente existem ou estão disponíveis testes laboratoriais específicos para espécies selvagens, pelo que existe sempre um certo grau de incerteza associado aos cálculos aqui apresentados;
- Grande variedade de valores de especificidade e sensibilidade de testes de diagnóstico usados em vários trabalhos prévios que dificultam a comparação e interpretação dos resultados;
- Uso de valores de especificidade e sensibilidade no cálculo de prevalências de outras espécies (por exemplo, *Homo sapiens* e *Canis familiaris*) que não as objeto do ensaio, que, apesar de não ser o ideal, foi considerada a alternativa mais próxima;
- Em alguns testes, os valores de especificidade e sensibilidade tiveram de ser assumidos como 100%, dada a ausência de informação ou impossibilidade de atribuição de um valor (por exemplo, em ensaios de isolamento por cultura);
- Tipo de amostragem e agrupamento dos dados efetuado, que difere de outros estudos anteriormente realizados e dificulta a comparação com os mesmos;
- Problemas de amostragem e testagem dos animais amostrados, prejudicando o número de animais que puderam ser analisados, assim como resultados em falta ou prejudicados por falta de meios, de amostras ou de viabilidade;
- Complexidade da ecologia de doenças ao nível da fauna selvagem ou sinantrópica, devida ao elevado número de espécies que podem estar presentes, mas também à grande variabilidade de vias de contacto/transmissão existentes, períodos de incubação extremamente variáveis e alguns desconhecidos, relações entre espécies para formação de reservatórios de doença de difícil caracterização, possibilidade de manutenção/persistência dos agentes em territórios distintos e de vasta extensão, circulação de estirpes vacinais, entre outros... Todas estas variáveis são de difícil compreensão quando não há conhecimento de parte dos ciclos

¹⁹Duarte, A.; Fernandes, M.; Santos, N. & Tavares, L.(2012). Virological survey in free-ranging wildcats (*Felis silvestris*) and feral domestic cats in Portugal. *Veterinary Microbiology* (2012), doi:10.1016/j.vetmic.2012.02.033.

de vida, hábitos diários e frequência de interações entre estas espécies nestas localizações e que decerto influenciam estes parâmetros.

5.2 Grupos, doenças e possíveis impactos nas populações de lince

Das 25 doenças sob análise neste relatório, apenas para os agentes infecciosos em estudo no grupo 6 não se conseguiu obter resultados para todos os agentes em tempo útil.

Todavia, esta colaboração entre Instituições, associada à cedência de amostras e troca de dados são aspetos que devem ser realçados, por estreitarem relações entre Instituições e diferentes profissionais, contribuir para o enriquecimento nacional na produção de trabalhos em fauna selvagem e em última análise, e não menos importante, garantirem o interesse, envolvimento e participação de mais organizações na temática do restabelecimento das populações portuguesas de lince ibérico. O mesmo deverá ser referido relativamente à colaboração com a Universidade de Évora.

De uma forma simplista e redutora, os resultados obtidos neste estudo podem ser resumidos nas tabelas que se seguem (Tabelas 70 a 89), que apresentam as várias doenças por ordem decrescente de prevalência para os vários grupos em análise, quer para cada uma das áreas em estudo, quer para o total das três áreas.

Tabela 70: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 1 - Moura-Barrancos

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Toxoplasmose (Ac)	35,4% [21,7-51,4%]
Leptospirose (Ac)	33,3% [15,9-55,1%]
Parvovirose (v)	29,5% [17,2-45,3%]
Calicivirose felina (v)	23,5% [11,5-40%]
FelV (v)	15,8% [6,4-31%]
Coronaviroses (Ac)	6,3% [0,2-20,2%]
FIV (Ac)	0,4% [0-11,5%]
Rinotraqueíte felina (v)	0,4% [0-11,5%]
Esgana (v)	0% [0-7,4%]
Coronaviroses (v)	0% [0-22%]
Cytauxzoon (p)	0% [0-26,5%]
Brucelose (Is)	0% [0-73,1%]
Clamidiose (bact)	0% [0-12,9%]

Tabela 71: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 1 - Vale do Guadiana

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Toxoplasmose (Ac)	86,4% [60,4-99%]
Parvovirose (v)	46,3% [24,2-68,2%]
Leptospirose (Ac)	33,3% [6,3-72,9%]
Calicivirose felina (v)	20,5% [5,9-45,8%]
FelV (v)	9,2% [0-31,8%]
Coronaviroses (Ac)	5% [0-30,3%]
FIV (Ac)	3,5% [0-25,5%]
Rinotraqueíte felina (v)	0% [0-16,7%]
Esgana (v)	0% [0-16,7%]
Coronaviroses (v)	0% [0-29,1%]
Cytauxzoon (p)	0% [0-36,5%]
Brucelose (Is)	0% [0-63,2%]
Clamidiose (bact)	0% [0-22,2%]
Leptospirose (I)	0% [0-63,2%]

Tabela 72: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 1 - Serra do Caldeirão

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Parvovirose (v)	76,2% [57,6-88,6%]
Toxoplasmose (Ac)	33,8% [17,4-53,1%]
FelV (v)	15,8% [5,2-35,2%]
FIV (Ac)	8,6% [0,8-26,2%]
Leptospirose (Ac)	6,3% [0,3-30,5%]
Calicivirose felina (v)	5% [0-20,8%]
Coronaviroses (Ac)	1,6% [0-16%]
Rinotraqueíte felina (v)	0% [0-9,8%]
Esgana (v)	0% [0-9,8%]
Coronaviroses (v)	0% [0-32,6%]
Clamidiose (bact)	0% [0-12,4%]

Tabela 73: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 1 -Total

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Parvovirose (v)	48,4% [37,7-59,1%]
Toxoplasmose (Ac)	45% [34,5-56%]
Leptospirose (Ac)	23,3% [12,4-38,3%]
Calicivirose felina (v)	16,8% [9,5-26,7%]
FelV (v)	14,4% [7,7-24,3%]
Coronaviroses (Ac)	4,4% [0,5-12,7%]
FIV (Ac)	3,8% [0,2-11,2%]
Esgana (v)	0% [0-2,3%]
Coronaviroses (v)	0% [0-9,1%]
Cytauxzoon (p)	0% [0-17,6%]
Rinotraqueíte felina (v)	0% [0-4,2%]
Leptospirose (l)	0% [0-63,2%]
Brucelose (ls)	0% [0-52,7%]
Clamidiose (bact)	0% [0-5,5%]

Tabela 74: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 2 - Moura-Barrancos

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Esgana (Ac)	100% [100-100%]
Parvovirose (Ac)	92,9% [85,5-97,9%]
Coronaviroses (Ac)	84,9% [76,1-91,7%]
Brucelose (LL)	30,8% [11,3-58,7%]
Leishmaniose (Ac)	24,2% [16,2-34,2%]
Brucelose (RB)	12,2% [7-20,3%]
Leptospirose (Ac)	7,4% [3,8-13,5%]
Brucelose (FC)	3,5% [1-9,9%]
Brucelose (Im)	0% [0-15,9%]

Tabela 75: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 2 - Vale do Guadiana

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Esgana (Ac)	100% [100-100%]
Coronaviroses (Ac)	92,2% [82,8-98,3%]
Parvovirose (Ac)	91% [81,6-97,2%]
Leishmaniose (Ac)	39,2% [29,1-50,5%]
Leptospirose (Ac)	2,6% [0,5-8,9%]
Brucelose (RB)	0% [0-4,9%]
Brucelose (FC)	0% [0-6%]
Brucelose (Im)	0% [0-6,1%]

Tabela 76: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 2 - Serra do Caldeirão

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Esgana (Ac)	100% [99,6-100%]
Coronaviroses (Ac)	100% [97,5-100%]
Parvovirose (Ac)	96,7% [88,7-100%]
Leishmaniose (Ac)	39,8% [30-50,5%]
Leptospirose (Ac)	2% [0,1-10,7%]
Brucelose (RB)	0% [0-6,4%]
Brucelose (FC)	0% [0-5,4%]
Brucelose (Im)	0% [0-36,5%]
Brucelose (RL)	0% [0-8,8%]

Tabela 77: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 2 -Total

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Esgana (Ac)	100% [100-100%]
Parvovirose (Ac)	93,6% [89,3-96,9%]
Coronaviroses (Ac)	92,9% [88,4-96,4%]
Leishmaniose (Ac)	34,2% [28,5-40,2%]
Brucelose (LL)	30,8% [11,3-58,7%]
Brucelose (RB)	5,1% [2,9-8,7%]
Leptospirose (Ac)	4,8% [2,7-8,4%]
Brucelose (FC)	1,4% [0,4-4,1%]
Brucelose (Im)	0% [0-4,1%]
Brucelose (RL)	0% [0-8,8%]

Tabela 78: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 3 - Moura-Barrancos

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Parvovirose (v)	39% [28,3-50,2%]
Leptospirose (Ac)	18,2% [8,2-34,7%]
Tuberculose (bact)	3% [0,2-16,1%]
Coronaviroses (v)	0,4% [0-6,7%]
Esgana (v)	0% [0-2,7%]
Leptospirose (I)	0% [0-29,1%]
Brucelose (RB)	0% [0-24,3%]
Brucelose (FC)	0% [0-17,3%]
Brucelose (Im)	0% [0-73,1%]
Brucelose (RL)	0% [0-41,1%]
Brucelose (Is)	0% [0-14,5%]
Pasteurelose (bact)	0% [0-24,3%]
Coccidiose (p)	0% [0-73,1%]
Leishmaniose (Ac)	0% [0-41,6%]
Leishmaniose (p)	0% [0-13,4%]

Tabela 79: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 3 - Vale do Guadiana

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Parvovirose (v)	61,7% [35,9-81,9%]
Coronaviroses (v)	4,6% [0-30,7%]
Leptospirose (Ac)	0% [0-50%]
Tuberculose (bact)	0% [0-37,7%]
Esgana (v)	0% [0-20,3%]
Leptospirose (I)	0% [0-50%]
Brucelose (RB)	0% [0-52,7%]
Brucelose (FC)	0% [0-57,3%]
Brucelose (RL)	0% [0-73,1%]
Brucelose (Is)	0% [0-37,7%]
Pasteurelose (bact)	0% [0-52,7%]
Leishmaniose (p)	0% [0-36,4%]

Tabela 80: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 3 - Serra do Caldeirão

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Parvovirose (v)	45,6% [28,3-64,5%]
Leptospirose (Ac)	0% [0-29,1%]
Tuberculose (bact)	0% [0-63,2%]
Coronaviroses (v)	0% [0-9,8%]
Esgana (v)	0% [0-9,8%]
Brucelose (RB)	0% [0-22,5%]
Brucelose (FC)	0% [0-19,1%]
Brucelose (RL)	0% [0-52,7%]
Brucelose (Is)	0% [0-73,1%]
Pasteurelose (bact)	0% [0-73,1%]
Coccidiose (p)	0% [0-73,1%]
Leishmaniose (Ac)	0% [0-75,6%]
Leishmaniose (p)	0% [0-73,1%]

Tabela 81: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 3 -Total

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Parvovirose (v)	43,4% [34,6-52,6%]
Leptospirose (Ac)	12,5% [5,6-24,8%]
Tuberculose (bact)	2,3% [0,1-12,4%]
Coronaviroses (v)	0,4% [0-5,2%]
Esgana (v)	0% [0-1%]
Leptospirose (I)	0% [0-22,2%]
Brucelose (RB)	0% [0-11,5%]
Brucelose (FC)	0% [0-9,3%]
Brucelose (Im)	0% [0-73,1%]
Brucelose (RL)	0% [0-26,5%]
Brucelose (Is)	0% [0-10,8%]
Pasteurelose (bact)	0% [0-19,6%]
Coccidiose (p)	0% [0-77,6%]
Leishmaniose (Ac)	0% [0-38%]
Leishmaniose (p)	0% [0-9,8%]

Tabela 82: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 4 - Moura-Barrancos

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Doença de Aujeszky (Ac-Domésticos)	11,1% [8,4-14,4%]
Tuberculose (bact)	11,1% [2-33%]
Leptospirose (Ac)	11,1% [5,3-21,3%]
Brucelose (RB)	8,5% [3,4-18,5%]
Doença de Aujeszky (Ac)	7% [0,17-31,9%]
Brucelose (FC)	4% [0,7-13,5%]
Brucelose (RB-domésticos) 2013 2012	0,007% [0,002-0,02%] 0,005% [0,001-0,02%]
Doença de Aujeszky (v)	0% [0-54,5%]
Tuberculose (tuberculina-Domésticos) 2013 /2012	0% [0-0%]
Brucelose (Is)	0% [0-18,5%]
Pasteurelose (bact)	0% [0-18,5%]
Paratuberculose (Ac)	0% [0-5,9%]

Tabela 83: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 4 - Vale do Guadiana

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Doença de Aujeszky (Ac-Domésticos)	33,9% [29,4-38,8%]
Doença de Aujeszky (Ac)	29,3% [13,9-50,5%]
Brucelose (FC)	28,6% [11,9-54,3%]
Brucelose (RB)	17,4% [6,2-38,9%]
Leptospirose (Ac)	5,3% [0,3-25,7%]
Brucelose (RB-domésticos) 2013 2012	0,015% [0,008-0,026%] 0,027% [0,017-0,041%]
Doença de Aujeszky (v)	0% [0-38,4%]
Tuberculose (tuberculina-Domésticos) 2013/2012	0% [0-0%]
Tuberculose (bact)	0% [0-8,5%]
Brucelose (Is)	0% [0-8,8%]
Paratuberculose (Ac)	0% [0-15,9%]

Tabela 84: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 4 - Serra do Caldeirão

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Brucelose (FC)	16,7% [3-47,2%]
Brucelose (RB)	8,3% [0,4-37%]
Leptospirose (Ac)	6,3% [0,3-30,5%]
Doença de Aujeszky (Ac)	5,1% [0,07-25,8%]
Brucelose (RB-domésticos) 2013 2012	0,22% [0,162-0,296%] 1,146% [1,007-1,302%]
Doença de Aujeszky (Ac-Domésticos)	0% [0-11,5%]
Tuberculose (bact)	0% [0-29,1%]
Doença de Aujeszky (v)	0% [0-54,5%]
Tuberculose (tuberculina-Domésticos) 2013/2012	0% [0-0%]
Brucelose (Is)	0% [0-17,6%]
Pasteurelose (bact)	0% [0-29,1%]
Paratuberculose (Ac)	0% [0-22,5%]

Tabela 85: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 4 -Total

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Doença de Aujeszky (Ac-Domésticos)	21,1% [18,5-24%]
Doença de Aujeszky (Ac)	15,8% [8,1-28,1%]
Brucelose (FC)	11,2% [5,8-20,5%]
Brucelose (RB)	10,6% [5,7-18,5%]
Leptospirose (Ac)	9,2% [4,7-16,7%]
Tuberculose (bact)	2,8% [0,5-9,5%]
Brucelose (RB-domésticos) 2013 2012	0,04% [0,03-0,05%] 0,18% [0,16-0,2%]
Doença de Aujeszky (v)	0% [0-21,7%]
Tuberculose (tuberculina-Domésticos) 2013/2012	0% [0-0%]
Brucelose (Is)	0% [0-5%]
Pasteurelose (bact)	0% [0-11,9%]
Paratuberculose (Ac)	0% [0-3,8%]

Tabela 86: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 5 - Moura-Barrancos

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Coccidiose (p)	10,3% [3,6-24,1%]
Leptospirose (Ac)	0% [0-24,3%]
Leptospirose (I)	0% [0-77,6%]
Pasteurelose (bact)	0% [0-52,7%]
Tularémia (real)	0% [0-7,7%]
Tularémia (conv)	0% [0-36,3%]
Toxoplasmose (Ac)	0% [0-14%]

Tabela 87: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 5 - Vale do Guadiana

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Coccidiose (p)	14,3% [6,4-28,4%]
Toxoplasmose (Ac)	7,5% [0,3-26,8%]
Leptospirose (Ac)	0% [0-22,5%]
Leptospirose (I)	0% [0-73,1%]
Pasteurelose (bact)	0% [0-15,2%]
Tularémia (real)	0% [0-5,6%]
Tularémia (conv)	0% [0-100%]

Tabela 88: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 5 - Serra do Caldeirão

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Coccidiose (p)	13,8% [4,9-30,8%]
Leptospirose (I)	0% [0-77,6%]
Tularémia (real)	0% [0-11,5%]
Toxoplasmose (Ac)	0% [0-75,7%]

Tabela 89: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 5 -Total

Doença (técnica utilizada)	Prevalência real [IC 95%]
Coccidiose (p)	12,7% [7,6-20,4%]
Toxoplasmose (Ac)	3,1% [0-13,7%]
Leptospirose (Ac)	0% [0-13,4%]
Leptospirose (I)	0% [0-50%]
Pasteurelose (bact)	0% [0-12,9%]
Tularémia (real)	0% [0-2,6%]
Tularémia (conv)	0% [0-33,6%]

No entanto, as condicionantes mencionadas anteriormente, assim como informação existente sobre as várias doenças em estudo, obrigam a uma discussão mais detalhada dos resultados obtidos.

5.2.1 Agentes não detetados nas áreas em estudo

5.2.1.1 Grupo 1 - Felídeos domésticos/ferais/selvagens

Para o grupo 1 foi prevista a análise de 11 doenças, mas para a Esgana, Cytauxzoonose e Clamidiose, nenhum resultado positivo foi obtido pelos ensaios usados com as amostras recolhidas.

No caso do vírus da esgana, a vacinação de gatos contra a doença provocada por este agente não faz parte dos protocolos de vacinação, por se considerar que, apesar do potencial que estes animais têm para produção de anticorpos neutralizantes, estes não desenvolvem sinais clínicos de doença (Greene & Lutz 2012)²⁰, pelo que as prevalências nulas calculadas poderiam ser consideradas como representativas de ausência de circulação do vírus neste grupo. Contudo, um estudo para determinação da presença de anticorpos contra este vírus seria mais elucidativo neste ponto, uma vez que o período de excreção deste vírus é curto e Duarte e colaboradores (2012) já detetaram em Portugal continental, e especificamente em gatos-bravos, anticorpos contra este vírus com uma prevalência de 7,7%, 2 em 26 amostras testadas (IC 2,1-24,1%). Possivelmente uma análise neste sentido nas três regiões aqui em estudo poderia ser mais elucidativa neste aspeto.

Uma vez que noutras espécies de felídeos já foram identificados casos de esgana (por exemplo, encefalite em lince-do-Canadá, *Lynx canadensis*, descrito por Daoust *et al.* 2009²¹), seria importante no futuro perceber o papel deste agente patogénico nestas três regiões. Inclusivamente, Millan *et al.* (2008) já encontraram gatos seropositivos ou infetados em Sierra Morena e Doñana para o lince ibérico e pelo menos um lince ibérico encontrado morto por Meli *et al.* (2009), nestas áreas, apresentava cargas virais deste agente tão elevadas que a causa de morte foi indicada como sendo provavelmente devida a este vírus.

Relativamente à presença de *Cytauxzoon felis*, as amostras recolhidas poderão não ter sido as ideais para o ensaio acordado (tipo e qualidade), pelo que uma região (Serra do Caldeirão) ficou por analisar porque todas as amostras recolhidas não eram adequadas ao ensaio escolhido. Como tal as prevalências não serão representativas das três áreas do projeto. No entanto, é de referir que casos de infeção em gatos são dificilmente passíveis de ser encontrados, dado o desenvolvimento agudo dos mesmos. Para além disso, ainda não é entendida a importância deste agente na saúde e estabilidade das populações de lince ibérico. Casos de infeção ativa já foram reportados por Millan *et al.* (2008), embora não seja ainda completamente conhecido o seu potencial patogénico desde a primeira vez que a sua identificação foi feita em Espanha por Luace *et al.* (2005)²².

Paralelamente, casos de sobrevivência de gatos domésticos com parasitémias já foram reportados, encontrando-se ainda em discussão a possibilidade da existência de hospedeiros sãos (Cohn & Birkenheuer 2012²³), que poderão constituir um risco para a transmissão deste agente a outras espécies, se a possibilidade de contacto existir e o vetor/hospedeiro intermediário ideal estiverem presentes.

²⁰Greene, C. E. & Lutz, H. (2012). Feline Paramyxovirus infections. In Greene, C.E. ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4^{ed}, Elsevier Saunders, USA, capítulo 16, 164-165.

²¹Daoust, P.-Y.; McBurney, S. R.; Godson, D. L.; Van de Bildt, M. W. G. & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Canine distemper virus-associated encephalitis in free-living lynx (*Lynx canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) of Eastern Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(3), 611-624.

²²Luaces, I.; Aguirre, E.; Garcia-Montijano, M.; Velarde, J.; Tesouro, M.A.; Sánchez, C.; Galka, M.; Fernández, P. & Sainz, Á. (2005). First report of an intraerythrocytic small piroplasm in wild Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 41(4), 810-815.

²³Cohn, L.A. & Birkenheuer, A.J. (2012). Cytauxzoonosis. In Greene, C.E. ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4^{ed}, Elsevier Saunders, USA, capítulo 75, 765-771.

No caso da Clamidiose, parte das amostras recolhidas não foram processadas, o que claramente poderá estar a influenciar as prevalências calculadas.

Independentemente da possível presença ou ausência deste agente patogénico nestas localizações, o seu impacto no lince ibérico ainda não está claro (assim como em outras espécies de gatos selvagens) e uma vez que estudos sobre esta doença nestes grupos e nestas três zonas não são conhecidos (desconhecendo-se igualmente a existência de semelhantes estudos para outras localizações), a análise deste agente neste momento é de difícil concretização.

5.2.1.2 Grupo 2 - Canídeos domésticos/ferais/assilvestrados

Para o grupo 2 estiveram em análise 6 doenças e para estas alguns dos ensaios (vírus da Esgana, parvovirus, e leptospira) poderão ter apenas detetado a presença de anticorpos de origem vacinal, o que dificulta a análise de determinação da presença destes agentes em circulação no grupo de canídeos. Este ponto foi corrigido em outros estudos, como, por exemplo, o de Millan *et al.* (2008), que decidiram não incluir animais vacinados na sua amostragem de forma a encontrar possíveis situações de reservatório. Mas e apesar deste possível contrassenso, os dados aqui presentes, principalmente os que se referem às elevadas seroprevalências nas doenças virais (Esgana e Parvovirose), representam possivelmente bons indicadores de cobertura vacinal deste grupo de animais e decerta forma poderão constituir formas de prevenir a transmissão destes agentes entre elementos do grupo 2 nestas localizações e destes para outras espécies, incluindo o lince ibérico, se os esquemas usuais de vacinação forem respeitados e forem usadas vacinas seguras para todas estas espécies.

Esta possível proteção poderá explicar as baixas seroprevalências calculadas para Leptospirose no grupo 2, quando comparadas com os restantes grupos, e em particular os baixos títulos encontrados para *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (e ausência de Canicola) e o *shift* verificado na presença de altos títulos de anticorpos para serovares para os quais não se imuniza (Hartmann & Greene 2004²⁴; Greene *et al.* 2012²⁵).

Ainda neste ponto, seria de interesse avaliar o mesmo conjunto de doenças em canídeos ferais nas zonas mais rurais para se determinar a existência de reservatórios e o potencial impacto nas futuras populações de lince ibérico.

5.2.1.3 Grupo 3 - Outros carnívoros selvagens

Para o grupo 3 estiveram em análise 9 doenças, mas prevalências nulas foram calculadas para Leishmaniose, Coccidiose, Pasteurelose, Brucelose e Esgana. Se para a Pasteurelose e Coccidiose problemas de amostragem, ou a sua qualidade, poderão constituir razões para as baixas prevalências encontradas, nas restantes doenças a ausência de positivos poderá apresentar uma significância epidemiológica importante.

No que respeita à Esgana, também Millan *et al.* (2008) reportaram prevalências nulas, tanto para contacto como infeção ativa, mas apenas em sacarrabos, gineta e texugos. Em raposas, aquelas foram ambas da ordem dos 30% (17 amostrados para anticorpos e 21 para a presença do agente).

Contudo, no presente estudo, 40 amostras de raposas foram analisadas para este agente patogénico e em nenhuma amostra foi detetada a presença do mesmo.

²⁴Hartmann, K. & Greene, C.E.(2004). Diseases caused by systemic bacterial infections. In Ettinger, S.J. & Feldman, E.C.ed. *Textbook of veterinary internal medicine*. 6ªed, ELSEVIER Saunders, USA, capítulo 165, 616-619.

²⁵ Greene, C.E.; Sykes, J.E.; Moore, G.E.; Goldstein, R.E. & Schultz, R.D. (2012). Leptospirosis. In Greene, C.E. ed. *Infectious diseases of the dog and cat*.4ªed, Elsevier Saunders, USA, capítulo 42, 431-446.

Outros estudos em Espanha, como o de Sobrino *et al.* (2009)²⁶, e em Portugal, o de Santos *et al.* (2009)²⁷, encontraram neste grupo de carnívoros, anticorpos anti-esgana em espécies como o lobo (*Canis lupus*) e a raposa (*Vulpes vulpes*).

Assim para entender se realmente o vírus se encontra em circulação nas três regiões em estudo e perceber o seu potencial impacto, ou determinar possíveis espécies reservatório importantes, uma análise à presença de anticorpos contra este vírus, como já foi proposta para o grupo 1, poderia ser mais elucidativa.

Relativamente à análise de amostras deste grupo para determinação da presença de bactérias do género *Brucella* ou anticorpos anti-brucella, e apesar de se ter verificado o mesmo tipo de problemas que no estudo da Coccidiose e Pasteurelose, nenhum microrganismo foi isolado ou identificado e também não foram detetados anticorpos. De facto, estes resultados e as baixas prevalências encontradas poderão indicar ausência de exposição/infeção nas várias espécies deste grupo. Contudo na Europa já foram isolados estes microrganismos em exemplares da espécie *V. vulpes*, acreditando-se que a fauna selvagem poderá constituir um potencial reservatório de infeção para determinadas espécies (Godfroid 2012²⁸). Possivelmente a amostragem conseguida, armazenamento/preservação das amostras e o número de amostras viáveis não permitiram detetar casos positivos.

No caso da doença causada pelo hemoparasita *Leishmania sp.*, a deficiente qualidade ou quantidade de amostras assim como falta de meios laboratoriais, resultaram no não processamento de algumas amostras e obtenção de resultados prejudicados. Possivelmente, estes fatores poderão explicar o facto de não se terem obtido resultados positivos para a deteção de anticorpos e material genético deste agente. As prevalências assim calculadas constituem um resultado que não era esperado, uma vez que pelo menos uma das áreas amostradas (Algarve) é reconhecida como endémica para Leishmaniose e esperar-se-ia encontrar resultados positivos, dado o comportamento tipicamente oportunista das espécies de flebótomos encontrados nesta região (Maia *et al.* 2009²⁹). No entanto, há que salientar que em Portugal e noutros países europeus, foram desenvolvidos estudos sobre leishmaniose em carnívoros selvagens e já se identificaram situações de infeção/exposição em espécies como *Canis lupus*, *Vulpes vulpes*, *Herpestes ichneumon*, *Genetta genetta*, *Meles meles*, *Mustela putorius*, *Martes martes* (marta) e *Martes foina* (Semião-Santos *et al.* 1996³⁰; Sobrino *et al.* 2008³¹; Rocha 2013³²; Del Río *et al.* 2014³³). Alguns destes estudos sugerem até que se desenvolvem ciclos silváticos de infeção independentemente da presença do considerado principal hospedeiro e reservatório

²⁶Sobrino, R.; Arnal, M. C.; Lucio, D. F. & Gortázar, C. (2009). Prevalence of antibodies against canine distemper virus and canine parvovirus among foxes and wolves from Spain. *Veterinary Microbiology*, 126, 251-256.

²⁷Santos, N.; Almendra, C. & Tavares, L. (2009). Serologic survey for canine distemper virus and canine parvovirus in free-ranging wild carnivores from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(1), 221-226.

²⁸Godfroid, J. (2012). Brucellosis. In Gavier-Widén, D.; Duff, J. P. & Meredith, A. ed. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Wiley-Blackwell, UK, capítulo 24, 318-328.

²⁹Maia, C.; Afonso, M.O.; Neto, L.; Dionísio, L. & Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *Journal of Vector Borne diseases*, 46, 268-272.

³⁰Semião-Santos, S. J.; Abranches, P.; Silva Pereira, M. C.; Santos Gomes, G. M.; Fernandes, J. P. & Vetter, J. C. (1996). Reliability of serological methods for detection of Leishmaniasis in portuguese domestic and wild reservoirs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91, 747-750.

³¹Sobrino, R.; Ferroglio, E.; Oleaga, A.; Romano, A.; Millán, J.; Revilla, M.; Arnal, M. C.; Triscioglio, A. & Gortázar, C. (2008). Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*, 155, 198-203.

³²Rocha, H. M. B. (2013). Epidemiovigilância das infecções por *Leishmania spp.* no efectivo cinotécnico da Guarda Nacional Republicana e mesocarnívoros silvestres. *Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciencias e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa*. Agosto 2013.

³³Del Río, L.; Chitimia, L.; Victoriano, I.; De la Rúa, P.; Gerrikagoitia, X.; Barral, M.; Muñoz-Garcia, C. I.; Goyena, E.; García-Martínez, D.; Fisa, R.; Riera, C.; Murcia, L.; Segovia, M. & Berriatua, E. (2014). Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 113, 430-435.

desta doença, *Canis familiaris* (Sobrinho *et al.* 2008), pelo que o papel/impacto que este grupo de animais pode ter no desenvolvimento de doenças no lince não pode ser negligenciado.

5.2.1.4 Grupo 4 - Ungulados domésticos e selvagens

Para o grupo 4 estiveram em análise 6 doenças, mas para a Paratuberculose e a Pasteurelose não se encontraram resultados positivos.

A *Pasteurella haemolytica* (ou *Mannheimia haemolytica*,) tratando-se de um organismo comensal da nasofaringe de mamíferos, é frequentemente isolada em ruminantes domésticos e selvagens e pode em determinadas circunstâncias (por exemplo, stress ou presença concomitante de outros microrganismos) estar na origem de quadros de pneumonia e septicémia, geralmente em exemplares mais jovens deste grupo de animais (Ferroglio 2012³⁴).

No presente estudo, foram recolhidas amostras para a análise desta doença, mas nem todas chegaram a ser processadas, o que dificulta a análise da presença do agente patogénico nesta parte do país, como está explícito no caso da região do Vale do Guadiana onde nenhuma foi processada.

Assim, em nenhuma das 28 amostras processadas se conseguiu isolar este agente patogénico. As amostras analisadas foram aquelas que poderiam indicar uma situação de doença nestas populações, visto que os resultados obtidos com a utilização de zaragatoas não teriam qualquer significância, dado o comensalismo deste microrganismo (Estudo de Gonzalez-Candela de 2006³⁵ em cabra montês, *Capra pyrenaica hispanica*, no sul de Espanha). Os resultados negativos obtidos não indicam que este agente não se encontra nestes animais e nestas localizações, mas mostra que situações de doença estão ausentes.

O impacto que este microrganismo poderá ter no lince é ainda difícil de compreender, sabendo-se que pelo menos dois exemplares já morreram devido a uma bactéria do género *Pasteurella* (Grupo de manejo del lince ibérico 2011³⁶). Deste modo, o papel que este agente poderá ter nas futuras populações portuguesas de lince ibérico é difícil de caracterizar, uma vez que as prevalências aqui calculadas não podem ser consideradas como representativas das zonas amostradas e a ausência de estudos anteriores neste grupo de animais e nestas localizações dificulta a análise desta doença no presente contexto de avaliação do estado sanitário das populações de animais selvagens.

O contrário aconteceu com a Paratuberculose, tendo a grande maioria das amostras recolhidas sido analisadas. O agente da Paratuberculose, capaz de provocar enterites crónicas de grande significância económica, infeta primariamente ruminantes domésticos ou selvagens, podendo no entanto também ser encontrado em outras espécies selvagens e mesmo em várias espécies de carnívoros, que poderão entrar em contacto com este agente possivelmente por intermédio da partilha de habitat e/ou consumo de animais infetados. Até ao momento sabe-se que o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* já foi identificado em várias espécies de carnívoros selvagens na Europa, como por exemplo *Vulpes vulpes*, *Mustela erminea* (arminho), *Mustela nivalis* (doninha-anã) e *Meles meles*, em países como a Escócia, a Grécia e a Espanha (Beard *et al.* 2001³⁷, Florou *et al.* 2008³⁸, Balseiro *et al.* 2011³⁹).

³⁴Ferroglio, E. (2012). Pasteurella infections. In Gavier-Widén, D.; Duff, J. P. & Meredith, A. ed. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Wiley-Blackwell, UK, capítulo 23, 310-317.

³⁵Gonzalez – Candela, M.; Cubero – Pablo, M.J.; Martin - Atance, P. & Leon - Vizcaino, L. (2006). Potential pathogens carried by Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) in Southern Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 42, 325 – 334.

³⁶Grupo de manejo sanitario del lince ibérico. (2007). *Manual sanitario del lince ibérico*. II versión Julio 2011

³⁷Beard, P. M.; Daniels, M. J.; Henderson, D.; Pirie, A.; Rudge, K.; Buxton, D.; Rhind, S.; Greig, A.; Hutchings, M.R.; McKendrick, I.; Stevenson, K. & Sharp, J.M. (2001). Paratuberculosis infection on nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1517-1521.

No entanto, relativamente ao lince ibérico, desconhece-se se algum exemplar desta espécie foi analisado para detetar a exposição a esta bactéria e/ou determinar a sua presença naquele. Acrescenta-se que a Paratuberculose é talvez a doença da listagem de doenças em análise que não tem sido estudada tão exaustivamente em fauna selvagem como as restantes e, como tal, o número de estudos publicados não é tão vasto como o que existe para as outras etiologias em consideração. De facto, esta é a única doença daquela lista para a qual não foi definido o potencial impacto em populações de lince ou de outros felídeos não-domésticos. O contributo deste relatório passou pela análise de exposição de exemplares do grupo 4 a este agente. Nenhum animal do grupo apresentava lesões sugestivas desta doença e igualmente não apresentava anticorpos contra o seu agente, o que poderá realmente corresponder a situações em que não houve exposição.

No entanto, podem ter ocorrido situações em que o animal foi recentemente infetado ou se encontra nas fases iniciais de infeção, sem ter ainda produzido o título adequado de anticorpos (tipo ou quantidade) para o teste de diagnóstico escolhido, e não ter sido detetadas por este método (Manning & Sleeman 2012⁴⁰), que não foi adaptado para as espécies em análise (algo frequente em outros estudos, como indica Lindén 2012⁴¹).

Entretanto, uma das espécies aqui testadas, *Cervus elaphus*, possivelmente poderá nem sequer ser um reservatório para manutenção deste agente na Península Ibérica (Carta *et al.* 2012⁴²) apesar de já ter sido identificado este agente nesta espécie. Neste sentido poderia ser de interesse analisar prevalências desta infeção ou exposição em espécies domésticas nas três regiões, uma vez que a transmissão entre estes pode ocorrer e não estariam presentes problemas de validação de ensaios (Daniel *et al.* 2003⁴³). Adicionalmente, uma análise de outros grupos relacionados pela ecologia desta doença, à semelhança do que foi feito no caso da Toxoplasmose, poderia esclarecer o papel que este microrganismo poderá desempenhar nestas regiões, uma vez que seria estudada outra via de transmissão deste agente patogénico, possivelmente mais verosímil que a predação de ungulados por lince ibéricos (apesar da contaminação ambiental por ungulados poder ocorrer e constituir outra via de transmissão).

Assim a análise dos grupos 3 e 5 para esta doença poderia acrescentar novos dados a este estudo, não só porque os lagomorfos correspondem à presa ideal do lince, tendo já sido identificados casos de Paratuberculose nestas espécies, inclusivamente na Península Ibérica (Greiget *al.* 1999⁴⁴, Maio *et al.* 2011⁴⁵), mas também pelo facto dos

³⁸Florou, M.; Leontides, L.; Kostoulas, P.; Billinis, C.; Sofia, M.; Kyriazakis, I. & Lykotrafitis. (2008). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol. Infect.*, 136, 644-652.

³⁹Balseiro, A.; Rodríguez, O.; González-Quirós, P.; Merediz, I.; Sevilla, I.A.; Davé, D.; Dalley, D.J.; Lesellier, S.; Chambers, M.A.; Bezos, J.; Muñoz, M.; Delahay, R. J.; Gortázar, C. & Prieto, J. M. (2011). Infection of Euroasian badgers (*Meles meles*) with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* complex in Spain. *The Veterinary Journal*, doi:10.1016/j.tvjl.2011.04.012.

⁴⁰Manning, E. J. B. & Sleeman, J. M. (2012). Johne's disease and free-ranging wildlife, in Miller, R. E. & Fowler, M. E. *Fowler's Zoo and wild animal medicine Current therapy*, volume 7, ELSEVIER Saunders, capítulo 81, 628-635.

⁴¹Lindén, A. (2012) Paratuberculosis or Johne's disease. In Gavier-Widén, D.; Duff, J. P. & Meredith, A. ed. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Wiley-Blackwell, UK, capítulo 20, 281-288.

⁴²Carta, T.; Martín-Hernando, M. P.; Boadella, M.; Fernández-de-Mera, I. G.; Balseiro, A.; Sevilla, I. A.; Vicente, J.; Maio, E.; Vieira-Pinto, M.; Alvarez, J.; Pérez-de-la-Lastra, J. M.; Garrido, J. & Gortázar, C. (2012). No evidence that the wild red deer (*Cervus elaphus*) on the Iberian Peninsula are a reservoir of *Mycobacterium avium* subspecies. [Abstract]. *The Veterinary Journal*, 192(3), 544-546.

⁴³Daniels, M. J.; Hutchings, M. R.; Beard, P. M.; Henderson, D.; Greig, A.; Stevenson, K. & Sharp, M. (2003). Do non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice-versa in Scotland?. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(1), 10-15.

⁴⁴Greig, A.; Stevenson, K.; Henderson, D.; Perez, V.; Hughes, V.; Pavlik, I.; Hines II, M.E.; McKendrick, I. & Sharp, J.M. (1999). Epidemiology study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), 1746-1751.

carnívoros selvagens serem potencialmente um seu equivalente trófico nesta associação.

5.2.1.5 Grupo 5 - Lagomorfos e roedores selvagens

Para o grupo 5 estiveram em análise 5 doenças da lista proposta para estudo e para a Tularémia, Pasteurelose e Leptospirose não foram obtidos resultados positivos.

Novamente problemas de qualidade ou adequação das amostras poderão estar na origem do baixo número de amostras processadas para a Pasteurelose e a prevalência de 0% encontrada.

Para a Tularémia, doença septicémica altamente infecciosa que afeta primariamente espécies dos géneros *Rodentia* e *Lagomorfa*, as prevalências encontradas foram baixas, tanto para o método de amplificação combinada como o convencional. No entanto, e tal como já foi referido, o tipo de amostras disponíveis e usadas não foram as ideais para detetar material genético deste agente, quando se tem em consideração o seu mecanismo patogénico nas espécies deste grupo (Gyuranecz 2012⁴⁶).

Possíveis vetores biológicos ou mecânicos deste agente patogénico foram encontrados no decurso deste projeto, como os exemplares de *Dermacentor reticulatus* e *Ixodes ricinus*, mas nenhum foi analisado para a presença deste agente e dos que foram recolhidos diretamente de animais, nenhum se encontrava em espécies do grupo 5.

Contudo, o possível papel que outras espécies podem desempenhar no ciclo desta doença, nem que não seja só pela transmissão por movimentação de vetores, não pode ser negligenciado. Acrescenta-se que seria interessante analisar no grupo 6 a presença deste agente, uma vez que Gyuranecz (2012) considera que estes artrópodes são verdadeiros reservatórios que podem perpetuar situações enzoóticas entre períodos de focos de doença, que poderiam não estar a ocorrer nos momentos em que as amostras foram recolhidas no decurso deste projeto.

Outro ponto a ter em atenção é que apenas foi avaliado um dos ciclos da Tularémia, o terrestre, ficando a dúvida se o ciclo aquático desta doença poderá existir nestas localizações e influenciar a variante terrestre, na qual se insere a principal presa do Lince ibérico, para o qual se desconhecem casos de exposição ou infeção por este agente, apesar de já se terem identificado anticorpos em *Lynx canadensis* no Canadá (Bieket al. 2002)⁴⁷.

Quanto à Leptospirose, o grupo 5 foi o único dos grupos testados em que não se isolou o agente nem se detetaram anticorpos. Este resultado foi inesperado, uma vez que este grupo é considerado como um dos mais importantes hospedeiros de serovares de *L. interrogans*, incluindo os de potencial zoonótico (Birtles 2012b⁴⁸). Anticorpos contra os serovares Icterohaemorrhagiae e Autumnalis, comumente considerados como tendo evoluído para explorar primariamente hospedeiros do grupo 5 (Greene et al. 2012), foram identificados em canídeos e cervídeos neste estudo e de certa forma tornam esta ausência de resultados positivos ainda menos esperada.

⁴⁵ Maio, E.; Carta, T.; Balseiro, A.; Sevilla, I.A.; Romano, A.; Ortiz, J.A.; Vieira-Pinto, M.; Garrido, J.M.; Pérez de la Lastra, J.M. & Gortázar, C. (2011). Paratuberculosis in European wild rabbits from the Iberian Peninsula. *Research in Veterinary Science*, 91(2), 212-218.

⁴⁶Gyuranecz, M.(2012). Tularaemia. in Gavier-Widén, D.; Duff, J.P. & Meredith, A. ed. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Wiley-Blackwell, UK, capítulo 22, 303-309.

⁴⁷Biek, R.; Zarnke, R.L.; Gillin, C.; Wild, M.; Squires, J.R. & Poss, M.(2002). Serologic survey for viral and bacterial infections in western populations of Canada Lynx (*Lynx canadensis*). *Journal of Wildlife Diseases*, 38(4), 840-845.

⁴⁸Birtles, R. (2012)b. *Leptospira* infections. In Gavier-Widén, D.; Duff, J.P. & Meredith, A. ed. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Wiley-Blackwell, UK, capítulo 33, 402-408.

No entanto, há que referir que no grupo 2 apenas foram encontrados anticorpos em título inferior à positividade do ensaio, ficando por esclarecer se no caso do serovar *Icterohaemorrhagiae* a sua presença poderá ser devida à administração de vacina neste grupo ou exposição ambiental (e neste caso se esta foi nas áreas do projeto ou fora, nos locais de origem das matilhas) ou ainda devida a exposições prévias.

No caso de cervídeos, os resultados positivos foram encontrados para o serovar *Autumnalis*, o que poderá de facto indicar contato com exemplares infetados do grupo 5 na região. Contudo, a possibilidade de contacto com outras espécies de outros grupos pode também ter permitido este achado, embora este serovar não tenha sido identificado nos restantes grupos em estudo.

Possivelmente o número de amostras processadas não foi o adequado para representatividade e estudo da presença/exposição a este agente patogénico neste grupo.

5.2.2 Agentes detetados nas áreas em estudo

Indícios de exposição e possivelmente infeção foram encontrados para as restantes doenças e merecem uma análise individual e face ao grupo em estudo.

5.2.2.1 FIV e FeLV

Considerando as doenças felinas, foram encontrados gatos domésticos com anticorpos contra FIV e uma vez que não existe vacina em Portugal, os resultados aqui presentes são indicativos de circulação do vírus nas populações daquela espécie nestas três regiões. As prevalências totais e regionais encontradas para esta doença foram inferiores às da presença do antigénio p27 do FeLV, algo encontrado também por Duarte *et al.* (2012) que referem que a patogenia da infeção por FeLV é provavelmente a razão para esta disparidade. Existe um maior número de vias de transmissão para este agente, desde marcação territorial a cuidados neonatais, do que apenas agressões em casos de luta por territórios ou aquando da reprodução em localizações de altas densidades e reduzida dimensão no caso de infeção por FIV (o que provavelmente não se verificará nestas áreas). Por sua vez e comparando o valor destas prevalências com as de outros estudos, as de FIV são superiores ao encontrado para gatos domésticos e selvagens em Portugal por Duarte *et al.* (2012) (0% de prevalência em 50 amostras IC 0-7,1%) e as de FeLV foram inferiores aos vários valores descritos e referenciados neste estudo para esta zona do país (>20%), no entanto ambas são muito semelhantes ao encontrado por Millán *et al.* (2008), em Doñana e Sierra Morena.

No entanto neste último ponto há que ter em consideração que as prevalências calculadas neste relatório pela deteção do antigénio de FeLV devem ser sempre entendidas como um sub-valor do que realmente é possível de ser encontrado, uma vez que ocorrem períodos de latência num animal infetado que se caracterizam por incapacidade de deteção do antigénio p27 por ELISA (Hartmann 2012⁴⁹) e apenas se recorreu a este ensaio para estudar esta doença, ao contrário de Millán *et al.* (2008). Também o próprio método usado para detetar anticorpos anti-FIV não é o ideal, uma vez que não consegue identificar casos de infeção recente (Sellon & Hartmann 2012⁵⁰) que podem ter passado por negativos em gatos amostrados nas mesmas localizações de onde amostras positivas foram recolhidas e que pudessem estar infetados.

⁴⁹Hartmann, K.(2012). Feline Leukemia Virus Infection. In Greene, C.E.ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4ªed, Elsevier Saunders, USA, capítulo 11, 108-136.

⁵⁰Sellon, R.K. & Hartmann, K. (2012).Feline Immunodeficiency virus infection. In Greene, C.E. ed. *Infectious diseases of the dog and cat*.4ªed, Elsevier Saunders, USA, capítulo 12, 136-150.

Assim, os dados aqui presentes merecem especial atenção uma vez que, pelo menos para o caso da Leucemia felina, sabe-se que o potencial para influenciar negativamente a dinâmica de populações de lince ibérico em liberdade já foi comprovado (foco de FeLV descrito por López *et al.* 2009⁵¹ e Meli *et al.* 2009) e sistematicamente vários estudos indicam que o contacto com patogénicos virais (FIV, FeLV, CDV, FCov entre outros) é raro nesta espécie e que possivelmente não existirá imunidade adquirida que possa salvaguardar a sobrevivência destes animais caso o contacto com outras espécies ocorra e permita transmissão (Roelke *et al.* 2007⁵², Millan *et al.* 2008 e estudos citados).

5.2.2.2 *Coriza felina*

No que respeita a agentes responsáveis pela síndrome de coriza felino, para os quais foram encontrados resultados positivos, apenas material genético de calicivirus e herpesvirus felinos foi detetado nas amostras recolhidas do grupo 1, o que representa um possível risco para o lince, visto que a grande maioria dos animais infetados pode tornar-se portadora de infeção latente de longa duração ou mesmo persistente (como no caso da rinotraqueíte), capazes de excretar o vírus ou mantê-lo em circulação por reinfeção (Gaskell *et al.* 2012⁵³). E apesar do estado vacinal dos animais amostrados ser desconhecido, e mesmo havendo a possibilidade de estes estarem vacinados, as vacinas disponíveis no mercado não protegem completamente da infeção e do desenvolvimento deste estado portador pelo que o risco para as futuras populações de lince existirá sempre, embora possivelmente diminuído pela ação da vacina no desenvolvimento de infeção e nos padrões de excreção viral destas populações domésticas.

De facto, em Espanha, e apesar de não se conhecerem casos de isolamento destes agentes em lince, as seroprevalências obtidas nesta espécie têm sido consideradas elevadas relativamente a outras espécies de felídeos selvagens, algo que por exemplo Meli *et al.* (2009) justificaram como sendo devido ao contacto com as populações de felídeos domésticos, algo já decerta forma suspeitado e confirmado para o calicivirus felino em *Lynx rufus* (lince-pardo), cujas áreas de dispersão incluíam zonas residenciais habitadas por *F. catus* (Riley *et al.* 2004)⁵⁴.

Relativamente às prevalências encontradas neste projeto e a sua possível representatividade das regiões amostradas, as de calicivirus foram superiores às do herpesvirus. Contudo há que ter em conta que no caso da rinotraqueíte felina, o vírus entra em latência em vários órgãos do animal e apenas é excretado em situações de *stress* (Gaskell *et al.* 2012), pelo que, fora destas e pelo método usado, possivelmente amostras de indivíduos que pudessem estar infetados podem ter passado como falsos-negativos.

Por sua vez a própria prevalência de calicivirus poderá ser um sub-valor, já que várias estirpes deste vírus podem existir e não serem detetadas quando todas as sequências não são usadas ou identificadas para análise. Simultaneamente, também poderá ser

⁵¹López, G.; López-Parra, M.; Fernández, L.; Martínez-Granados, C.; Martínez, F.; Meli, M. J.; Gil-Sánchez, J.M.; Viqueira, N.; Díaz-Portero, M. A.; Cadenas R.; Lutz, H.; Vargas, A. & Simón, M.A. (2009). Management measures to control a feline leucemia virus outbreak in the endangered Iberian lynx. *Animal Conservation* 12, 173-182.

⁵²Roelke, M. E.; Johnson, W. E.; Millan, J.; Palomares, F.; Revilla, E.; Rodríguez, A.; Calzada, J.; Ferreras, P.; León-Vizcaíno, L.; Delibes, M. & O'Brien, S.J. (2007). Exposure to disease agents in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *European Journal of Wildlife Research*, DOI 10.1007/s10344-007-0122-2.

⁵³Gaskell, R. M.; Dawson, S. & Radford, A. (2012). Feline respiratory disease. In Greene, C.E.ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4^{ed}, Elsevier Saunders, USA, capítulo 14, 151-162.

⁵⁴Riley, S. P.; Foley, J. & Chomel, B. (2004) Exposure to feline and canine pathogens in bobcats and gray foxes in urban and rural zones of a national park in California. *Journal of Wildlife Diseases* 40, 11-22.

um sobre-valor, por se desconhecer o historial de vacinação dos animais amostrados (Gaskell *et al.* 2012).

Fazendo uma comparação com outros estudos nacionais ou internacionais, nenhum dos disponíveis optou por analisar a presença de antigénios nas amostras, mas Millan *et al.* (2008) estudaram seroprevalências em gatos domésticos da região de Sierra Morena e Doñana e obtiveram valores inferiores para calicivirus (10%, 44 animais testados) não tendo sido analisado o agente da Rinotraqueíte felina.

5.2.2.3 Parvovirose e Coronavirose

Quando considerando as doenças virais capazes de afetar os vários grupos de carnívoros (1, 2 e 3), relativamente às parvovirose e já não considerando o grupo 2 para o qual os animais foram vacinados, as prevalências encontradas foram das mais elevadas. Contudo para a sua interpretação, seria ideal conhecer os hábitos de vacinação do grupo dos felídeos, o seu estado de saúde, conhecer áreas de dispersão dos animais dos grupos 1 e 3 ou frequência de possíveis contactos, e até mesmo perceber se existe sobreposição de territórios. Com esta informação seria possível explicar, por exemplo, a razão da diferença entre regiões ter sido considerada estatisticamente significativa para o grupo 1, com possivelmente a região da Serra do Caldeirão a apresentar maior prevalência.

No único estudo disponível e que pode ser considerado equiparável a este, tanto pelo estudo de espécies simpátricas como pela tentativa de cruzar informação com o lince, as prevalências apresentadas para deteção de vírus em amostras em gatos de Doñana e Sierra Morena foi inferior à obtida neste relatório (<5% com 24 animais testados, Millan *et al.* 2008), salientando-se no entanto que apenas foi estudada a espécie *F. catus*. No estudo português de Duarte *et al.* (2012), as prevalências encontradas em felinos foram também inferiores ao encontrado aqui, incluindo as da região do Alentejo e Algarve (<10%, Duarte *et al.* 2012), algo que poderá estar relacionado com o esforço de amostragem descrito no presente relatório, incluindo possivelmente boa qualidade das amostras. Neste estudo cerca de 91 animais foram testados e casos de decomposição foram mínimos, enquanto que nos dois estudos citados apenas foram avaliados 58 e 64 animais, no estudo de Duarte *et al.* (2012) e Millan *et al.* (2008) respetivamente, com evidências de decomposição no primeiro. No entanto também a própria ecologia deste agente patogénico neste grupo e nestas regiões de Portugal poderá estar a influenciar estas disparidades.

Para o grupo 3, uma comparação entre estudos é mais difícil de realizar, uma vez que no estudo de Millan *et al.* (2008) os exemplares recolhidos foram tratados enquanto espécies individuais (*V. vulpes*, *H. ichneumon*, *G. genetta* e *M. meles*) e em nenhum foram encontrados indícios de infeção ativa por parvovirus. Todavia, foram reportadas evidências de contacto neste estudo em raposas, ginetas e sacarrabos, com prevalências entre os 10-20%. No estudo de Santos *et al.* (2009), por sua vez, também não foi procurado material genético em carnívoros selvagens, mas foram encontrados casos positivos para a deteção de anticorpos contra este agente em Portugal para várias espécies de carnívoros selvagens, como lobos, raposas, gatos-bravos, ginetas e fuínhas, chegando a seroprevalência a atingir os 94,4% (17/18) nas ginetas, indicando que em Portugal e nestas espécies existe contacto com vírus do género *Parvovirus*.

Comparando as prevalências, da ordem dos 40%, obtidas neste relatório com o mais recente trabalho português focando os mesocarnívoros portugueses, por Duarte *et al.* (2013), estas são inferiores ao encontrado (63%, 81 em 128), embora o tratamento individual das espécies e o agrupamento dos dados para o país sejam condições que dificultam a comparação entre estes dois estudos e a explicação para as diferenças encontradas.

A informação obtida para esta virose é de grande importância, uma vez que tanto a variante felina como a canina podem infectar felinos, constituindo importantes ameaças para o desenvolvimento de crias (Greene 2012⁵⁵). Para além disso, as prevalências aqui encontradas foram superiores ao encontrado em outros estudos. Acresce o facto de que o agente em questão, quer seja responsável pelo quadro de Panleucopénia felina quer de Parvovirose canina, existe em circulação nestes grupos e pode resistir no ambiente em situações de contaminação ambiental, idealmente por espécies reservatório.

Existem vários estudos que indicam exposição ou mesmo infeção do lince ibérico por Parvovirus (Roelke *et al.* 2007, Millan *et al.* 2008, Meliet *et al.* 2009). E apesar de apenas se conhecer um caso de uma mortalidade causada pelo desenvolvimento de um quadro de Panleucopénia felina nesta espécie (Simón *et al.* 2012⁵⁶), outros estudos em outras espécies felinas selvagens, por sua vez, já indicaram este agente como um perigo a considerar em populações de reduzidas dimensões e variabilidade genética (e consequentemente baixa resistência a doenças), como no caso de panteras, *Felis concolor coryi*, descrito por Roelke *et al.* (1993)⁵⁷. Estes dados e estudos reforçam assim o potencial que estes vírus têm como agente causador de doença e demonstram a importância da sua monitorização no caso do lince e no ecossistema onde este se insere.

Relativamente à presença ou exposição destes grupos aos coronavírus, nenhum dos grupos testados foi alvo de vacinação pelo que a presença do agente em amostras ou mesmo anticorpos anti-Cov podem potencialmente ser considerados como indicativos de exposições reais ao vírus em circulação. No grupo 2, novamente, foram identificadas prevalências elevadas de anticorpos contra este agente. No entanto e segundo Greene e Decaro (2012)⁵⁸, estudos serológicos têm sugerido que o Cov canino se encontra presente em populações caninas indefinidamente e apesar de poder causar quadros de enterite infecciosa, neste grupo de animais a frequência e gravidade dos mesmos são muito baixas e pouco problemáticas na maioria dos casos. No entanto, tal já não é o caso se o vírus infectar felídeos, uma vez que, e por recombinação com a variante felina, este também pode ser responsável pelo desenvolvimento da Peritonite Infecciosa felina, uma doença sem cura e fatal (Addie 2012⁵⁹), que já foi implicada como causa de importantes surtos de morbilidade e mortalidade em várias espécies como por exemplo chitas, *Acinonyx jubatus*, em parques dos USA descritos por Heeney *et al.* (1990)⁶⁰.

A variante felina anteriormente mencionada, sendo mundialmente a mais prevalente (Addie 2012) também é capaz de causar esta peritonite e como tal estas duas variantes foram alvo do presente estudo.

⁵⁵ Green, C.E. (2012). Feline Enteric viral infections. In Greene, C.E.ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4^aed, Elsevier Saunders, USA, capítulo 9, 80-91.

⁵⁶ Simón *et al.* (2012). *Ten years conserving the Iberian lynx*. Junta de Andalucía - Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente.

Disponível em:
http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal_web/servicios_generales/doc_tecnicos/2013/10_anos_lince/10_a_conservacion_lince.pdf

⁵⁷ Roelke, M. E.; Forrester, D. J.; Jacobson, E. R.; Kollias, G. V.; Scott, F. W.; Barr, M. C.; Evermann, J. F. & Pirtie, E. C. (1993). Seroprevalence of infectious disease agents in free-ranging Florida panthers (*Felis concolor coryi*). *Journal of Wildlife Diseases*, 29(1), 36-49.

⁵⁸ Greene, C. E. & Decaro, N. (2012). Canine enteritis. In Greene, C.E.ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4^aed, Elsevier Saunders, USA, capítulo 8, 76-79.

⁵⁹ Addie, D. D. (2012). Feline coronavirus infections. In Greene, C.E.ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4^aed, Elsevier Saunders, USA, capítulo 10, 92-108.

⁶⁰ Heeney, J. L.; Evermann, J. F.; McKeiman, A. J.; Marker-Kraus, L.; Roelke, M. E.; Bush, M.; Wildt, D. E.; Meltzer, D. G.; Colly, L. & Lukas, J. (1990). Prevalence and implications of feline coronavirus infections of captive and free-living cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Virology*, 64, 1964-1972.

As prevalências encontradas para os diferentes grupos testados na análise desta doença foram diferentes às encontradas no estudo de Millan *et al.* (2008) para felídeos e muito semelhantes para outros carnívoros. No caso de seroprevalências em felídeos, estas foram superiores a 10% (44 animais amostrados), para infecção sensivelmente 5% (24 animais testados) e 0% para todas as espécies que aqui figuram no grupo 3, à exceção da raposa que não foi amostrada por este estudo de 2008.

Por sua vez quando comparando o grupo 1 da presente análise com o estudo de Duarte *et al.* (2012), as prevalências para infecção calculadas foram muito inferiores ao encontrado por estes investigadores. As prevalências encontradas eram da ordem dos 20% para a totalidade do território português e para os distritos mais a Sul enquanto que nenhum animal com material genético de Coronavírus foi encontrado no presente estudo. Possivelmente esta disparidade poderá dever-se a diferenças de metodologias, tipo e qualidade das amostras ou então à inexistência de infeções ativas nos animais testados. O mesmo tipo de disparidade, possivelmente pelas mesmas razões já mencionadas, assim como possivelmente variações da produção de anticorpos no decurso da doença ou mesmo excreção viral (Addie 2012), foi observado quando se compara as seroprevalências. Nenhum animal testado por Duarte *et al.* (2012) apresentava anticorpos e no entanto no presente estudo 5 felinos em 82 possuíam anticorpos contra o agente desta doença e em três destes, foi tentada a amplificação de material genético com resultados negativos.

Ao ter-se detetado a presença de anticorpos e material genético nestes três grupos e nas três áreas em estudo, sabendo que anticorpos contra este vírus já foram identificados em lince por Meli *et al.* (2009) e sabendo o potencial que estes agentes têm para provocar doenças debilitantes e fatais, os resultados aqui reunidos constituem importantes dados a reter para a conservação desta espécie e manejo das espécies em análise.

5.2.2.4 Doença de Aujeszky

Quando considerando a doença de Aujeszky, doença dos foros respiratório, reprodutor e neurológico capaz de se manifestar num vasto leque de espécies selvagens (ungulados, carnívoros, lagomorfos e roedores, Ruiz-Fons 2012⁶¹), apenas amostras de *Sus scrofa* foram recolhidas e processadas para a análise de exposição ou infecção por este agente nas três áreas do projeto. Optou-se por esta metodologia, pois esta espécie é considerada o seu verdadeiro hospedeiro em fauna selvagem. As outras, pensa-se que são hospedeiros de fundo-de-saco que potencialmente, ora por ingestão de carcaças infetadas ou por contato direto ou indireto com animais infetados, tendem a morrer da doença antes de ser possível a excreção viral ou produção de títulos de anticorpos significativos (Ruiz-Fons 2012). Como tal são de pouca significância epidemiológica para a metodologia empregue neste estudo.

Poucas amostras para deteção de material genético deste herpesvírus foram processadas e destas nenhum resultado positivo foi obtido.

No entanto, há que referir que poderiam estar presentes casos subclínicos de infecção ou latência que não foram detetados por esta metodologia, dado o tipo de amostra utilizado.

O mesmo pode ter ocorrido com as amostras encaminhadas para o ensaio sorológico, que não consegue identificar casos em que o animal foi infetado mas o agente não se encontra disponível no organismo e consequentemente não é alvo de uma

⁶¹ Ruiz-Fons, F.(2012). Aujeszky's disease, or Pseudorabies. In Gavriel-Widén, D.; Duff, J.P. & Meredith, A. ed. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Wiley-Blackwell, UK, capítulo 1, 3-36.

resposta imunitária por parte do hospedeiro nem infeções recentes que não permitiram a construção de uma resposta detetável.

Outro ponto a considerar nesta última metodologia é que foi usado um método apenas validado para suínos, havendo autores a considerá-lo como falível (Ruiz-Fons 2012), pelo que existirá sempre um grau de incerteza na interpretação dos resultados aqui obtidos.

Quando comparando as prevalências obtidas para fauna selvagem, estas são inferiores às de um estudo espanhol de Vicente et al. (2005)⁶² que analisou a região centro-Sul espanhola, englobando Sierra Morena (>40%, amostragem superior a 100 indivíduos). Contudo, diferenças de metodologias e desconhecimento de como é feito o maneo destas populações são alguns dos aspetos que poderão contribuir para esta disparidade e dificultar esta análise. Dada a difícil disponibilização de dados de estudos portugueses, uma comparação em território português é de momento de difícil concretização.

Relativamente às populações domésticas, as prevalências calculadas para javalis neste estudo são também inferiores às calculadas a partir de dados do Plano de Erradicação para o total das regiões em ungulados domésticos. Todavia, regionalmente foi observada a mesma progressão entre estes dois grupos: prevalências mais elevadas foram encontradas para o Vale do Guadiana, seguindo-se Moura-Barrancos e finalmente Serra do Caldeirão. Ao considerar-se que existem diferenças significativas entre regiões para as prevalências em suínos domésticos, podendo a região do Vale do Guadiana apresentar maior número de casos, esta possível associação de progressões poderá levantar um problema quando a erradicação desta doença está em curso, como já foi defendido por Boadella et al. (2012)⁶³. Estes autores constataram que, por um período de 10 anos, a seroprevalência em javalis em parte da Península ibérica manteve-se estável e poderá prejudicar este tipo de planos, visto aqueles animais permanecerem como reservatórios de infeção de populações domésticas, contribuindo para a existência de mais uma via de transmissão e um hospedeiro de manutenção do agente nestas regiões.

Relativamente ao potencial que este agente patogénico tem para desenvolver quadros clínicos na fauna selvagem, não foram encontrados sinais ou lesões sugestivas de um quadro de doença de Aujeszky nos animais seropositivos, algo que é possivelmente concordante com o já referido em vários estudos compilados por Ruiz-Fons (2012): encontram-se em circulação estirpes de baixa virulência e casos de doença/morte nestas espécies são pouco frequentes.

No entanto, desconhece-se, para o intervalo de tempo deste projeto, se outras espécies selvagens foram infetadas e/ou morreram desta doença nas regiões em estudo. Esta informação, apesar de difícil ou mesmo de impossível obtenção, seria importante, dada a possibilidade destes ungulados poderem constituir reservatórios estáveis de infeção e constituírem uma potencial via de transmissão ao lince ibérico, para o qual não se conhecem casos de quadros clínicos sugestivos ou comprovados de doença de Aujeszky.

Mesmo assim e paralelamente, casos de doença em carnívoros já foram encontrados e reforçam o potencial negativo que este agente apresentará no caso do lince ibérico, como são exemplos os estudos de Glass et al. (1994)⁶⁴ na Pantera da Florida,

⁶² Vicente, V.; Ruiz-Fons, Vidal, D. Hofle, U.; Acevedo, P.; Villanú, D.; Fernández-de-Mera, I. G.; Martín, M. P. & Gortázar, C. (2005). Serosurvey of Aujeszky disease virus infection in European wild boar in Spain. *Veterinary Record*, 156, 408-412.

⁶³Boadella, M.; Gortázar, C.; Vicente, J. & Ruiz-Fons, F. (2012). Wild boar: an increasing concern for Aujeszky's disease control in pigs?. *BioMed Central Veterinary Research* 8(7).

⁶⁴Glass, C. M.; McLean, R.G.; Katz, J. B.; Maehr, D. S.; Cropp, C. B.; Kirk, L. J.; McKeirman, A. J. & Evermann, J. F. (1994). Isolation of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus from a Florida panther. *Journal of Wildlife Diseases*, 30(2), 180-184.

Cay e Letellier (2009)⁶⁵ e Cramer *et al.* (2011)⁶⁶ em cães, que indicam que possivelmente o consumo de carne de espécies infetadas de *Sus scrofa* poderá constituir uma via de transmissão a considerar e que poderá ocorrer no caso do lince ibérico, se este optar por este tipo de presas.

5.2.2.5 Tuberculose Bovina

As prevalências encontradas neste estudo não foram muito elevadas, mas o número de espécimes selvagens cujas amostras foram processadas também foi baixo, pelo que é difícil entender a relevância do que se observou nestes grupos e áreas.

No entanto, há que salientar que geralmente se encontram prevalências baixas em fauna selvagem, porque a maioria destas espécies funciona como hospedeiros fundo-de-saco, sendo incapazes de manter o agente nas populações sem reexposição (Backues 2008, Gavier-Widén *et al.* 2012 & Millán *et al.* 2008).

Contudo, nem toda a fauna selvagem pode ser considerada como vítima de spill-over. Em Portugal, os carnívoros podem funcionar como importantes vias de transmissão deste agente (Monteiro *et al.* 2011) e, como já foi referido a nível europeu, o *Sus scrofa* é reconhecido como um dos mais importantes reservatórios selvagens desta doença (Santos *et al.* 2009). Casos de infeção ativa em carnívoros selvagens como *V. vulpes*, *H. ichneumon* e *M. meles* (Mílan *et al.* 2008) foram encontrados em Espanha e apesar de apresentarem no geral prevalências baixas, como também foi o verificado no presente relatório, o papel que podem desempenhar enquanto transmissores deste agente não pode ser negligenciado face à reintrodução do lince ibérico em Portugal. Adicionalmente, tanto em Espanha como em Portugal, e em particular para as zonas em consideração e para ungulados silvestres, outros trabalhos como são exemplos os estudos espanhóis de Aranaz *et al.* (2004), Gortázar *et al.* (2008) e os portugueses de Santo *et al.* (2009/2011) já identificaram prevalências de Tuberculose que poderão ser consideradas preocupantes por serem referentes a uma das espécies reservatório e por serem superiores às aqui determinadas devido aos constrangimentos anteriormente mencionados.

Esta presença de animais positivos que partilhem o habitat com o lince ibérico e que possam interagir ou ser predados por este representa um perigo para a sanidade de futuras populações deste felídeo em Portugal, quer pelos efeitos deletérios que surgem com o desenvolvimento desta doença de caráter crónico quer pela mortalidade associada. A infeção ativa já foi encontrada nesta espécie em liberdade em Espanha por Millán *et al.* (2008), e um dos animais apresentava um quadro generalizado de Tuberculose. Anticorpos evidenciando exposição prévia também já foram detetados nesta espécie, nos últimos locais onde ainda resistem populações livres (Martín-Atance 2006). Apesar de terem sido isolados microrganismos do complexo da Tuberculose em animais selvagens com origem na região de Moura-Barrancos, como já fora encontrado por Santo *et al.* (2011), e apesar de não se ter identificado diferenças significativas nas prevalências calculadas para fauna selvagem e não podendo estas ser consideradas representativas face ao anteriormente referido, estas foram observadas no caso dos ungulados domésticos, estando possivelmente a zona de Moura-Barrancos a apresentar maior prevalência de infeção. Algo que poderá estar de acordo com o que tem sido sistematicamente sugerido em outros estudos que

⁶⁵Cay, A. B. & Letillier, C. (2009). Isolation of Aujeszky's disease virus from two hunting dogs in Belgium after hunting wild boars. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 78, 194-195.

⁶⁶Cramer, S.D.; Campbell, G.A.; Njaa, B.L.; Morgan, S.E.; Smith II, S.K.; McLin IV, W.R.; Brodersen, B.W.; Wise, A.G.; Scherba, G.; Langohr, I. M. & Maes, R. K. (2011). Pseudorabies virus infection in Oklahoma hunting dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(5), 915-923.

indicam uma possível relação entre populações domésticas e selvagens na ecologia desta doença nesta área em concreto (Cunha et al. 2011)

Contudo, e como já referido, a ecologia de doença em fauna selvagem e a interface com animais domésticos é complexa, encontrando-se ausentes vários parâmetros para a sua interpretação no presente contexto, tendo igualmente ocorrido enviesamentos de amostragem (a recolha de amostras de ungulados selvagens em montarias onde tendencialmente são abatidos mais indivíduos adultos).

Estes aspetos dificultam o estudo de prevalências representativas, a determinação de verdadeiros reservatórios e, em última instância, a análise do possível impacto que esta doença poderá ter no lince ibérico nestas regiões. Outro tipo de metodologias, como o recurso ao spoligotyping, como foi optado por Aranaz et al. (2004), poderia esclarecer esta interação entre espécies domésticas e selvagens neste intervalo de tempo em estudo.

Como a possibilidade de interação já foi alvo de estudo pelo menos no Alentejo, em que o contato/partilha de habitat foi suspeitado e verificado por, por exemplo, Raposo (2011) ou por VetNatura (2012), estes últimos indicando que as áreas de maior prevalência de Tuberculose bovina nas populações domésticas em Moura-Barrancos estavam associadas às áreas de maior densidade de veados, e como Duarte et al. (2007) encontraram, por sua vez, fortes evidências que sugerem a transmissão deste agente entre estas populações em pelo menos uma exploração naquela região, os dados obtidos nesta ação do projeto, deverão ser entendidos como dados que deverão ser analisados mais profundamente de forma a poder minimizar possíveis consequências negativas para a conservação do lince ibérico.

5.2.2.6 Leptospirose

Na análise desta doença verificou-se que um elevado número de amostras não foram processadas ou quando o foram, apenas resultados prejudicados foram encontrados. A decomposição de amostras, quantidade insuficiente de amostra, inadequação do tipo de amostra à pesquisa do agente/ensaio usado e contaminação por bactérias foram as principais razões para estas duas situações e decerto influenciam a representatividade dos resultados obtidos e prevalências calculadas.

De facto, apenas se conseguiu identificar possíveis casos de exposição a diferentes serovares deste agente patogénico e possivelmente a qualidade das amostras, padrões de excreção intermitentes ou inexistência de infeção com excreção do agente, poderão não ter propiciado o isolamento deste agente de crescimento fastidioso (OIE 2014⁶⁷). O teste serológico usado, considerado o "gold standard" para estudos de determinação de anticorpos, poderá não ter identificado casos de infeção crónica, em que são produzidos anticorpos mas não atingem o valor diagnóstico (OIE 2014), como poderão ser os casos observados e já mencionados no presente estudo em animais dos grupos 1 a 4, que não foram contabilizados como positivos.

No entanto, aqueles também poderão ser apenas representativos de situações de exposição prévia. Assim, o ideal seria ter acesso à história clínica de todos os animais amostrados, listagem de lesões observadas nos cadáveres recolhidos e proceder a uma repetição da análise serológica nos espécimes vivos para compreensão destes diferentes estados nos animais que foram incluídos neste estudo.

Apesar da importância que a Leptospirose pode ter em animais de companhia e de produção e dado o seu valor enquanto doença de interesse para a saúde pública, na realidade, e embora seja frequente o isolamento deste agente em um conjunto

⁶⁷ OIE. (2014). *Terrestrial Manual- Leptospirosis*, capítulo 2.1.9.

vastíssimo de animais selvagens, de acordo Birtles (2012b), o papel que este agente pode ter na morbilidade de fauna selvagem ainda não foi completamente clarificado. Todas as espécies selvagens que possuíam anticorpos contra este agente neste estudo já foram identificadas na Europa como espécies em que foram isoladas leptospiros ou para as quais evidências de contacto foram encontradas (Birtles 2012b). Os reservatórios primários conhecidos dos serovares, possivelmente infetantes, encontrados neste projeto correspondem na sua grande maioria a roedores, ungulados domésticos e carnívoros.

Contudo, várias das espécies amostradas neste estudo também já foram reconhecidas como reservatórios ou hospedeiros de manutenção daqueles agentes, pelo que também poderão funcionar como outras fontes de infeção, que não as primárias, para outros animais (Greene *et al.* 2012). A obtenção de apenas resultados de serologia também não é esclarecedora neste aspeto, uma vez que não permite a identificação de um serovar infetante, mesmo havendo casos em que esteja com títulos de anticorpos acima do limiar estabelecido. O ideal seria conjugar esta informação com isolamentos positivos que não se conseguiram obter. Este facto é relevante para o presente estudo, uma vez que se verificou que pelo menos 4 dos 5 grupos testados apresentavam anticorpos contra este agente, constituindo assim possíveis fontes para outras espécies como o lince ibérico, como também Millán *et al* (2008) referem.

Pensa-se que os felinos domésticos parecem ser mais resistentes à infeção por leptospiros que os canídeos e o nível de conhecimento sobre o desenvolvimento de Leptospirose em felídeos é ainda muito limitado (Greene *et al.* 2012), mas sabe-se que em hospedeiros acidentais ou reservatórios imunocomprometidos o resultado da infeção por este tipo de agentes patogénicos poderá ser do tipo sistémico e fatal (Birtles 2012b). Logo, as seroprevalências obtidas para os 4 grupos (e as mais elevadas para o grupo 1), aliadas à vulnerabilidade reconhecida do *Lynx pardinus* a agentes patogénicos, poderão ser pontos problemáticos a considerar na reintrodução do lince e impacto nas suas futuras populações. Há pelo menos um caso em que estas espiroquetas foram responsáveis pela morte de um lince ibérico por falência renal (Simón *et al.* 2012).

5.2.2.7 Brucelose

Para esta doença vários métodos foram usados para detetar a presença/exposição a várias espécies de *Brucella* em amostras de animais dos grupos 2 a 4. No entanto e para qualquer um dos grupos, amostras por analisar, resultados prejudicados por hemólise excessiva ou falta de soro, ou dificuldade na análise de soros pela presença de microrganismos com atividade anti-complemento, foram alguns dos condicionalismos encontrados para o estudo desta doença e extrapolação dos resultados para as áreas em estudo.

Estiveram em análise *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* e *Brucella canis* e para todos os grupos testados já foram descritos isolamentos destes microrganismos (Godfroid 2012). Neste estudo, evidências da exposição a microrganismos do género *Brucella* foram encontradas apenas nos grupos 2 e 4 podendo este achado estar relacionado com os problemas identificados no grupo 3 ou com a ecologia das várias espécies em estudo.

Para a maioria dos casos documentados de exposição nos vários estudos compilados por Godfroid (2012), as seropositividades encontradas são descritas como podendo estar relacionadas com *spills-overs* das populações domésticas, que com o avançar dos programas de erradicação poderão não constituir ameaças à conservação de espécies.

No entanto, a comparação feita com os dados dos planos de erradicação parecem não o sugerir, uma vez que as regiões com as seroprevalências mais elevadas não coincidem.

Contudo, e como já referido, vários parâmetros encontram-se em falta para se entender a interação que possa existir na interface entre as populações de animais domésticos e selvagens. Também se desconhece se a possível presença de *B. suis* nestas regiões poderá estar a influenciar estes resultados, uma vez que é frequentemente isolada num vasto grupo de animais selvagens na Península Ibérica, reconhecidos como reservatórios deste agente (Muñoz *et al.* 2010⁶⁸), e visto os ensaios serológicos usados não permitirem distinguir as espécies de *Brucella* que originaram os casos de seropositividade (OIE 2009⁶⁹) e nenhuma cultura ter permitido isolar estes microrganismos.

Apesar de se terem encontrado seropositivos para *B. canis* no grupo 2, ainda não foram reportados casos em fauna selvagem na Europa (Godfroid 2012), pelo que de momento não é possível saber se esta espécie causadora de Brucelose canina pode infectar e provocar doença em espécies selvagens, incluindo o lince ibérico.

5.2.2.8 Toxoplasmose

No estudo da presença/exposição ao agente da Toxoplasmose, autólise/decomposição e situações de inadequação da amostra ao teste usado, impediram a análise das amostras recolhidas ou prejudicaram a obtenção de um resultado válido, particularmente no caso do grupo 5.

As seroprevalências mais elevadas foram encontradas no grupo dos felídeos, algo que é frequente em vários estudos (incluindo o de Millán *et al.* 2008) e que seria de esperar, uma vez que este corresponde ao grupo no qual se inserem as espécies que são hospedeiros definitivos e que excretam os oocistos para o ambiente.

Adicionalmente, as amostras processadas foram recolhidas em zonas rurais, onde se sabe que a frequência para desenvolvimento ou exposição é mais elevada, particularmente quando se considera animais adultos (Dubey & Lappin 2012⁷⁰), como foi o caso neste estudo.

No entanto, os valores aqui encontrados de seropositividade poderão ser uma sub-representação da realidade, uma vez que o teste apenas deteta a presença de imunoglobulinas G, estando descrito que em alguns felinos a produção destas poderá ocorrer apenas quatro a seis semanas após ingestão do hospedeiro intermediário (Dubey & Lappin 2012).

A utilização deste ensaio para animais testados uma única vez, impossibilita a determinação destes casos e a confirmação de situações de infeção ativa assim como não permite comprovar se existe excreção de oocistos para o ambiente (Dubey & Lappin 2012).

A grande variação observada no título de anticorpos detetado neste grupo, não pode ser entendida como indicadora de quadros clínicos de severidade distinta, uma vez que pode tratar-se apenas de reações individuais à exposição a este agente (Dubey & Lappin 2012). Para além disso, não se conhecendo o historial clínico dos animais, não é possível saber se estarão presentes casos de doença nesta amostra.

⁶⁸Muñoz, P. M.; Boadella, M.; Arnal, M.; de Miguel, M. J.; Revilla, M.; Martínez, D.; Vicente, J.; Acevedo, P.; Oleaga, A.; Ruiz-Fons, F.; Marín, C. M.; Prieto, J. M.; de la Fuente, J.; Barral, M.; Barberán, M.; de Luco, D. F.; Blasco, J. M. & Gortázar, C. (2010). Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. *BioMed Central Infectious Diseases*, 10(46).

⁶⁹OIE. (2009). *Terrestrial Manual 2009-Porcine Brucellosis*, capítulo 2.8.5.

⁷⁰Dubey, J. P. & Lappin, M.R. (2012). Toxoplasmosis and Neosporosis. In Greene, C.E.ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4ªed, Elsevier Saunders, USA, capítulo 79, 806-821.

Todos estes pontos constituem parâmetros de interesse para análise, uma vez que Millan *et al.* (2008) indicam que os gatos podem ser responsáveis pelas altas prevalências de anticorpos encontradas no lince ibérico em liberdade.

Foram novamente encontradas diferenças significativas entre regiões para o grupo 1, contudo os mesmos problemas apontados anteriormente dificultam esta análise, como o desconhecimento de fatores comportamentais e ecológicos, entre outros.

Do número de amostras recolhidas e processadas do grupo 5, apenas 2 coelhos apresentavam evidências de exposição, conferindo baixas prevalências para toda a região e para as três áreas em estudo. Quando comparando as seroprevalências obtidas deste grupo com outros estudos como o de García-Bocanegra *et al.* (2009)⁷¹ em Doñana e Sierra Morena, estas também não eram muito elevadas 14/85 (11,9%).

Vários autores referem que esta baixa seroprevalência poderá dever-se ao posicionamento trófico dos herbívoros e seus hábitos de alimentação, podendo estes constituir uma via de transmissão importante para o lince ibérico. Estudos em carnívoros têm encontrado altas seroprevalências neste grupo de animais, quando comparados com omnívoros, herbívoros e insetívoros, e estas poderão ser resultantes do consumo dos níveis tróficos mais baixos infetados (Sobrinho *et al.* 2007⁷²).

Sabe-se que em gatos, doenças concomitantes ou imunossupressão tornam o hospedeiro mais suscetível a desenvolver esta doença, pois este parasita tende a comporta-se como um agente oportunista (Dubey & Lappin 2012). Deste modo, existe potencial para populações de felídeos vulneráveis virem a desenvolver esta doença, o que poderá ocorrer no caso do lince ibérico.

5.2.2.9 Leishmaniose

Apenas o grupo dos canídeos acusou exposição a este agente e como já referido, foram amostradas regiões endémicas, pelo que estes resultados seriam de esperar. As prevalências encontradas enquadram-se no que é normalmente encontrado em zonas endémicas, contudo há que considerar que o valor calculado de seroprevalência para este grupo poderá não ser o real, visto alguns animais terem sido vacinados contra esta doença, não tendo sido possível removê-los dos cálculos de prevalências.

Uma vez que os animais testados não são originários das regiões em estudo, mas apenas as frequentam durante as ações de caça, as prevalências calculadas não serão representativas daquelas três áreas, representando possivelmente fontes “externas” de infeção para os vetores e, como tal, mais uma via de transmissão deste parasita para o vetor na região e subsequentemente para outras espécies.

Mesmo com estes possíveis condicionalismos, as seroprevalências obtidas não diferem muito do que é encontrado em vários países endémicos (Solano-Gallego *et al.* 2009⁷³), mesmo quando considerando os locais de origem deste grupo de animais.

E tratando-se de uma doença de caráter crónico e para a qual não existe cura (Baneth & Solano-Gallego 2012⁷⁴), a presença deste agente e do seu vetor nestas três regiões são potenciais riscos para o lince ibérico em Portugal.

⁷¹ García-Bocanegra, I.; Dubey, J. P.; Martínez, F.; Vargas, A.; Cabezon, O.; Zorrilla, I.; Arenas, A. & Almería, S. (2009). Factors affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Parasitology* 167, 36-42.

⁷² Sobrinho, R.; Cabezon, O.; Millán, J.; Pabón, M.; Arnal, M.C.; Luco, D. F.; Gortázar, C.; Dubey, J. P. & Almería, S. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* 148, 187-192.

⁷³ Solano-Gallego, L.; Koutinas, A.; Miró, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Direction for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-8.

⁷⁴ Baneth, G. & Solano-Gallego, L. (2012). Canine Leishmaniosis. In Greene, C.E. ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4^{ed}, Elsevier Saunders, USA, capítulo 73, 734-750.

É de referir ainda que apenas se consideraram para análise desta doença o grupo dos carnívoros e canídeos domésticos, contudo e cada vez mais são encontradas evidências de que outras espécies selvagens poderão desempenhar importantes papéis na manutenção deste parasita nos ecossistemas, como são os casos de roedores e lagomorfos (Míllan *et. al* 2014⁷⁵), que não foram alvo deste estudo.

5.2.2.10 Coccidiose

Das várias coccídeas existentes e passíveis de serem identificadas pelo método de Willis, apenas exemplares da família Eimeriidae foram encontrados no grupo 5, especificamente em roedores. Problemas de qualidade ou adequação do tipo de amostra ao teste de diagnóstico usado poderão ter comprometido os resultados obtidos e as prevalências calculadas nos grupos amostrados. A ausência e impossibilidade prática de reamostragem poderão ter impedido a determinação de indivíduos com padrões de excreção mais errática.

Outro problema encontrado na análise desta doença está relacionado com o detalhe de informação disponibilizado sobre os parasitas encontrados. Seria de interesse saber o género ou até mesmo a espécie das coccídeas identificadas, uma vez que alguns géneros podem provocar doenças com consequências mais graves, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, como se sabe ser o caso de *Isoospora* em gatos (Dubey & Greene 2012⁷⁶). Apesar de ser apenas conhecido um trabalho em que foi identificado este tipo de parasitas em lince ibérico, sem que este demonstrasse sinais clínicos de doença (Rodríguez & Carbonell 1998⁷⁷), a presença destes agentes patogénicos pode constituir uma possível ameaça a espécies que se sabe serem mais suscetíveis, como é o caso do lince ibérico.

Esta informação poderia, adicionalmente e possivelmente, esclarecer de forma indireta o estado sanitário de outras espécies de outros grupos aqui em estudo (particularmente o grupo 3 que está sub-representado), se estivessem presentes espécies com ciclos heteroxenos ou para as quais se conhecem reservatórios de concentração/hospedeiros paraténicos.

5.2.2.11 Riquetsioses e Febre Q

Relativamente aos agentes estudados no grupo 6, foi identificado *Anaplasma marginale* e *Candidatus Midichloria mitochondrii*, o primeiro mais frequentemente encontrado em ruminantes, incluindo os selvagens e o outro descoberto no aparelho reprodutor de fêmeas de *Ixodes ricinus* e para qual se desconhece se estará associado a processos patogénicos (Sassera *et al.* 2006⁷⁸; Birtles 2012a⁷⁹).

Contudo, e como parte das carraças foram recolhidas da vegetação, não se sabe de que grupos de animais se alimentaram e se estes exibiam sinais de doença. Esta informação seria de utilidade, uma vez que, para todos os agentes patogénicos em estudo potencialmente transmitidos por carraças, a capacidade para provocarem

⁷⁵Míllan, J.; Ferroglio, E. & Solano-Gallego, L. (2014). Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitology Research*.doi:10.1007/s00436-014-3929-2.

⁷⁶Dubey, J. P. & Greene, C. E. (2012). Enteric Coccidiosis. In Greene, C.E.ed. *Infectious diseases of the dog and cat*.4ªed, Elsevier Saunders, USA, capítulo 80, 828-839.

⁷⁷Rodríguez, A. & Carbonell, E. (1998). Gastrointestinal parasites of the Iberian lynx and other wild carnivores from central Spain. *ActaParasitologica*, 43(3), 128-136.

⁷⁸Sassera, D.; Beninati, T.; Bandi, C.; Bouman, E.A.P.; Sacchi, L.; Fabbri, M. & Lo, N.(2006). "*Candidatus Midichloria mitochondrii*", an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with an unique intramitochondrial lifestyle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2535-2540.

⁷⁹Birtles, R. (2012a). Rickettsiales infections. In Gavier-Widén, D.; Duff, J.P. & Meredith, A. ed. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Wiley-Blackwell, UK, capítulo 28, 363-371.

doença clínica em fauna selvagem é ainda desconhecida (Birtles 2012a; Cunningham & Yabsley 2012⁸⁰).

No entanto, o potencial para causar doença existe sempre nestas infeções, uma vez que, podendo afetar elementos do sistema circulatório e imunitário, entre outros, podem permitir o desenvolvimento de doenças com consequências mais graves ou por associação com outras serem importantes causas de morte, como são exemplo as epidemias fatais observadas em leões, *Panthera leo*, descritas por Munson *et al.* (2008)⁸¹ em África, por coinfeção de *Babesia* e vírus da Esgana.

A presença destes vetores e agentes patogénicos nas regiões em estudo e este potencial para provocarem doença em populações debilitadas constituem possíveis riscos para espécies mais sensíveis. É o caso do lince ibérico que já foi encontrado parasitado por este tipo de vetores, tendo sido reportados casos de infeção/exposição a estes agentes nas áreas chave espanholas (Millán *et al.* 2007⁸²; Millán *et al.* 2008⁸³; Meli *et al.* 2009⁸⁴).

Adicionalmente, a identificação de *Coxiella burnetii*, agente patogénico responsável pela febre Q, que não estava incluído na lista de doenças em análise, permitiu um ganho valioso de informação relativamente à sua presença na fauna selvagem.

Visto serem escassos os trabalhos de investigação destes agentes e, em termos globais, existirem poucos relatos de doença em fauna selvagem, ainda não se entende completamente qual o papel que esta desempenha na epidemiologia da infeção por este agente em termos da sua transmissão ao ser humano, animais domésticos ou entre várias espécies selvagens (Ruiz-Fons 2012⁸⁵).

⁸⁰Cunningham, M. W. & Yabsley, M. J. (2012). Primer on tick-borne diseases in exotic carnivores. In Miller, R. E. & Fowler, M. E. *Fowler's Zoo and wild animal medicine Current therapy*, volume 7, ELSEVIER Saunders, capítulo 59, 458-464.

⁸¹Munson, L.; Terio, K. A.; Kock, R.; Mlengyea, T.; Roelke, M. E.; Dubovi, E.; Summers, B.; Sinclair, A. R. E. & Packer, C. (2008). Climate extremes promote fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions. *PLoS One* 3(6), doi:10.1371/journal.pone.0002545.

⁸²Millán, J.; Ruiz-Fons, F.; Márquez, F. J.; Viota, M.; López-Bao & Martín-Mateo, M. (2007). Ectoparasites of the endangered Iberian lynx *Lynx pardinus* and sympatric wild and domestic carnivores in Spain. [Abstract]. *Medical and Veterinary Entomology*, 21(3), 248-254.

⁸³ Millán, J.; Candela, M. G.; Palomares, F.; Cubero, M. J.; Rodríguez, A.; Barral, M.; de la Fuente, J.; Almería, S. & León-Vizcaíno, L. (2008). Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *The Veterinary Journal* (2008). doi:10.1016/j.tvjl.2008.04.005.

⁸⁴Meli, M. L.; Cattori, V.; Martínez, F.; López, G.; Vargas, A.; Simón, M. A.; Zorrilla, I.; Muñoz, A.; Palomares, F.; López-Bao, J.V.; Pastor, J.; Tandon, R.; Willi, B.; Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H., (2009). Feline leukemia virus and other pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *PLoS ONE* 4, e4744. (3): e4744. doi:10.1371/journal.pone.0004744.

⁸⁵ Ruiz-Fons, F. (2012). *Coxiella burnetii* infection. In Gavier-Widén, D.; Duff, J.P. & Meredith, A. ed. *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Wiley-Blackwell, UK, capítulo 34, 409-412.

6 Conclusões e perspectivas futuras

Toda a metodologia empregue e resultados conseguidos neste estudo decerto constituem a base para futuros programas de vigilância que são unanimemente considerados como imprescindíveis, não só no caso da reintrodução de espécies com estatutos de conservação reservados, como também para garantir a manutenção de estatutos de indemnidade nas populações domésticas, para melhorar estratégias de atuação no controlo e erradicação de doenças endémicas e ainda na vigilância de doenças emergentes ou re-emergentes, e tendo, como objetivo último, a criação de uma rede nacional de epidemiovigilância da fauna selvagem.

No entanto, e dada a impossibilidade de analisar lince nas três áreas do projeto, a importância que cada prevalência têm ou terá em populações de lince ibérico num contexto português dificilmente é percebida, sobretudo quando se sabe que existe sempre um risco associado ao desenvolvimento de doenças infecciosas em situações de translocação de espécies selvagens (o animal reintroduzido pode transportar novas doenças para o ambiente recetor ou pode adquirir novas doenças durante o processo de translocação ou ulteriormente quando já presente neste ambiente).

Por serem inúmeros os casos na literatura que evidenciam as consequências nefastas que translocações de espécies podem ter quando não corretamente ponderadas, quando se fala numa espécie quase em extinção, com reduzida variabilidade genética e sensível a vários agentes patogénicos e sendo o lince ibérico considerado como uma espécie emblemática da Península Ibérica, dado o seu endemismo nesta localização, é inegável que o que se pretende é que possíveis casos de recolonização e, em especial de reintrodução sejam um sucesso.

Contudo, este risco sempre presente, pode comprometer o sucesso do próprio processo de reintrodução e inviabilizar todos os esforços que foram feitos, deitando por terra todas as expectativas que foram criadas ao longo destes anos.

Assim, nos territórios previstos para a reintrodução poderão ser implementadas algumas medidas de controlo das principais doenças com maior impacto na saúde do lince ibérico e em outras espécies. Concomitantemente, deverá ser assegurada a monitorização das doenças das espécies simpátricas, sejam elas silvestres, domésticas ou ferais, através de uma rede de epidemiovigilância ativa, devendo estar acautelados os recursos financeiros para a sua execução futura.

As doenças mais importantes que, de acordo com o presente estudo e com os casos documentados de infeção/doença em lince ibérico, deverão ser alvo de maior atenção neste sentido são a Leucemia Felina, a Tuberculose Bovina, a Esgana, a Parvovirose, a Imunodeficiência Felina, a Leptospirose e a Pasteurelose:

- Evidências de infeção por Leucemia felina foram encontradas neste estudo, em gatos domésticos de ambientes rurais nas três áreas em análise com a prevalência global de 14,4% (IC=7,7-24,3%). Pelo que estes achados poderão representar um possível perigo a considerar para a conservação do lince ibérico nesta região de Portugal;

- No caso da Tuberculose, em um javali, um muflão e uma gineta, todos da região de Moura-Barrancos, foram isolados microrganismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Dado que estando em curso o plano de erradicação desta doença em

ungulados domésticos e havendo sistematicamente relatos de contato entre estas interfaces, as diferenças significativas encontradas para as prevalências em explorações naquela região poderão estar na origem de casos nessa localização e representar um fator que pode dificultar a sobrevivência deste felino, merecendo estes dados ser alvo de uma análise mais detalhada, futuramente;

- Apesar de não se ter determinado a presença de material genético de Esgana nos grupo 1 e 3 e sabendo que para Portugal indícios de exposição já foram encontrados, a determinação de anticorpos à exposição a este vírus aliada a detecção do agente nestas regiões, deverão ser pontos a ter em consideração numa avaliação futura para melhor compreensão da sua possível circulação nestas três áreas e perceber o possível impacto que poderá ter nas futuras populações portuguesas, visto que o potencial para causar efeitos deletérios já foi descrito no lince-ibérico;

- Relativamente às Parvoviroses, prevalências elevadas foram encontradas tanto para o grupo dos felídeos como o dos restantes carnívoros silvestres nas três áreas em estudo ($PR_{\text{grupo1}}=48,4\%$, $IC=37,7-59,1\%$; $PR_{\text{grupo3}}=43,4\%$, $IC=34,6-52,6\%$). Amostras positivas foram recolhidas de espécies assilvestradas/silvestres como *V. vulpes*, *G. genetta*, *M. meles*, *M. putorius*, *M. foinea*, *H. ichneumon*, *L. lutra*, híbridos (*Felis catus* e *Felis silvestris*) e gatos domésticos, indicando que estas espécies e a presença deste vírus em circulação são parâmetros importantes a considerar na conservação de lince-ibérico;

- Considerando o caso da Imunodeficiência felina, foram encontrados gatos domésticos com anticorpos anti-FIV nas três áreas em estudo ($PR=3,8\%$, $IC=0,2-11,2\%$), sem que diferenças significativas fossem encontradas entre as prevalências de cada região. A presença deste agente nestas regiões, em gatos domésticos e em ambiente rural, poderá ser preocupante, se o contato ocorrer entre esta espécie e o lince ibérico, uma vez que são raros os casos documentados de exposição do último ao mesmo e recentemente Guilherme-Lopez e Serra (2014), em comunicação pessoal, referem terem identificado por PCR a presença deste agente num exemplar desta espécie, demonstrando o potencial para a infeção e vulnerabilidade desta espécie a este agente;

- Relativamente à leptospirose, foram encontrados em praticamente todos os grupos indícios de exposição a este agente, variando a prevalência para animais silvestres ou assilvestrados de 4,8% a 23,3% para a totalidade das três regiões em análise. No presente estudo não foram identificadas diferenças significativas entre as prevalências das três regiões para os grupos positivos que incluíram animais de espécies como: *F. catus*, *V. vulpes*, *H. ichneumon*, *S. scrofa* e *C. elaphus*, pelo que estes achados aliados à possibilidade de contaminação ambiental e persistência destes agentes no ambiente constituem pontos a ter em consideração para a reintrodução do lince ibérico em Portugal. Contudo e devido a problemas com o processamento de amostras do grupo dos lagomorfos ou roedores, ficou por perceber qual o papel que este grupo de animais poderá ter na transmissão e manutenção deste agente infeccioso nas regiões em estudo, pelo que será aconselhável proceder a uma nova recolha de amostras nesse sentido;

- Apesar de não se ter identificado *Pasteurella haemolytica* em nenhuma das amostras testadas e dado o número daquelas que não pôde ser processado, a inclusão desta doença neste grupo de doenças que merece mais atenção prende-se com o já reportado potencial patogénico que este agente tem no lince ibérico. Assim, e apesar

das prevalências de 0% obtidas neste relatório, futuramente seria ideal proceder a uma nova amostragem dos vários grupos nas três regiões para melhor compreensão da ecologia deste agente nesta região do país e possível impacto que poderá ter na conservação do lince ibérico neste país.

Outras doenças frequentes mas com pouco carácter virulento para esta espécie, como a Toxoplasmose, a Cytosporidiose, a Coriza felina, a Peritonite infecciosa felina e a Leishmaniose, deverão ser também contempladas, visto que para as duas primeiras, o lince ibérico pode ser reservatório natural para estes agentes, e assim sendo pode ter um papel ativo no contágio a outras espécies animais. Salienta-se que no caso da Toxoplasmose, no presente estudo, altas prevalências foram encontradas no grupo dos felídeos (45%) em espécies como *F. catus*, *F. silvestris* e *Felis sp.*, havendo possivelmente maior número de casos positivos à exposição a *Toxoplasma gondii* na região do Vale do Guadiana, reforçando a importância que este agente poderá ter na conservação do lince ibérico e outras espécies como o *F. silvestris*. E no caso do *Cytosporidium felis*, como a representatividade da amostragem ficou comprometida neste estudo, idealmente, e para compreensão do possível papel que este agente pode desempenhar nas áreas do projeto, uma nova recolha de amostras terá de ser ponderada para perceber se a prevalência de 0% calculada neste estudo terá significância epidemiológica.

Nas outras doenças referidas, em situações de imunossupressão do organismo, estes agentes podem tornar-se patogénicos para o lince ibérico e foram encontrados indícios da sua presença nos vários grupos amostrados neste estudo.

No caso da Coriza felina, material genético para o vírus da Calicivirose felina foi detetado em exemplares de *F. catus*, *F. silvestris* e *Felis sp.* (PR=16,8%, IC=9,5-26,7%), e em apenas um *F. catus* de Moura-Barrancos foi identificado material genético de herpesvirus felino (PR=0%, IC=0-4,2%). Deste modo, os presentes achados poderão ser possíveis indicadores da circulação destes vírus nesta parte de Portugal e possivelmente representam um risco à conservação desta espécie, e particularmente se estiverem presentes casos de infeções latentes de longa duração ou persistentes que possam constituir fontes de transmissão do vírus ao lince.

Também para o estudo de coronavírus foram encontrados casos de exposição ou presença do agente em animais dos grupos 1 a 3 (PR_{grupo 1}=4,4%, IC=0,5-12,7%; PR_{grupo 2}=92,9%, IC=88,4-96,4% e PR_{grupo 3}=0,4%, IC=0-5,2%), incluindo espécies como *F. catus*, *C. familiaris*, *G. genetta* e *H. ichneumon*, sem que diferenças significativas fossem encontradas para cada grupo relativamente a cada região. A presença destes agentes nestes grupos é de considerar uma vez que o potencial para a transmissão ao lince existe e se a mutação para a variante que causa a Peritonite Infecciosa Felina ocorrer e poder provocar um quadro semelhante ao dos gatos domésticos nesta espécie de felídeo selvagem, a sua sobrevivência poderá ser comprometida.

Relativamente à Leishmaniose e dado que algumas das freguesias amostradas para esta doença pertencem a regiões consideradas endémicas para Leishmaniose canina, resultados positivos à presença de anticorpos eram esperados e foram encontrados no grupo de matilhas de cães. No entanto a prevalência de 0% encontrada para o grupo 3, tanto para o método serológico como para o molecular, não era esperada nestes locais, pelo que poderá ser interessante, futuramente, tentar perceber a ecologia deste agente neste grupo de animais e nesta região de Portugal.

Outras doenças como a Doença de Aujeszky e Febre Q, deverão ser consideradas, porque poderão ter algum potencial patogénico.

No presente estudo, anticorpos anti-herpesvirus suíno foram encontrados em javalis (PR=15,8%, IC=8,1-28,1%) e estando o plano oficial desta doença em populações domésticas ainda longe da erradicação, a possibilidade de contato entre populações de ungulados domésticos e silvestres poderá permitir a transmissão do agente e os ungulados silvestres poderão constituir reservatórios estáveis de infecção para o lince. Relativamente a agentes veiculados por vetores (neste estudo carraças), de momento apenas foram analisados vetores recolhidos da vegetação das regiões de Moura-Barrancos e Vale do Guadiana e nestes foram encontrados casos positivos para a presença de material genético do agente responsável pela Febre Q (PR=26%, IC=16,9-37,6%). Futuramente ficarão disponíveis mais dados relativos às restantes carraças amostradas e agentes por elas veiculados.

Tendo em consideração as doenças acima referidas, as medidas de controlo que podem ser implementadas para reduzir os riscos da sua transmissão ao lince ibérico dependem não só das doenças visadas mas também do grupo de hospedeiros considerado.

Relativamente à maioria das doenças que afetam os cães e os gatos, como é o caso da Esgana, das Parvovirose, da Leucemia felina e da Coriza Felina, passam obviamente pela profilaxia vacinal e anti-parasitária dos hospedeiros reservatórios domésticos, mas também pelo controlo de animais errantes para a grande maioria das doenças que afetam aquelas espécies.

Relativamente às doenças encontradas nos hospedeiros reservatórios selvagens, as medidas passam sobretudo por ações de gestão e controlo de densidades, quando na perspetiva da conservação estas sejam aplicáveis, e pela eliminação adequada de subprodutos resultantes da prática cinegética, que podem constituir fontes de infecção de Tuberculose Bovina.

Paralelamente, medidas de segregação entre espécies domésticas e selvagens deverão ser aplicadas sempre que possível, de forma a interromper os ciclos de transmissão de doenças entre aqueles dois grupos.

Adicionalmente os indivíduos de lince ibérico a serem translocados, deverão ser submetidos a uma monitorização do estado de saúde, prevendo o rastreio das doenças já mencionadas anteriormente, de que poderão ser portadores, e eventualmente, serem submetidos a uma profilaxia vacinal e desparasitação (como está protocolado no "Manual Sanitario del Lince Ibérico"³⁵). Estas ações deverão ser prolongadas no tempo após o estabelecimento de territórios, e estendendo-se aos descendentes.

A DGAV, por sua vez, analisará a implementação de futuras medidas de controlo, a par das já contempladas nos planos de erradicação de doenças das espécies domésticas em vigor, podendo no futuro colaborar institucionalmente.

Em suma e tendo em conta estes resultados, sugestões e possíveis medidas de controlo, uma análise de risco da reintrodução do lince ibérico em solo português, com os resultados desta ação, surge, neste momento como o passo natural a seguir. Uma vez que representa um método multidisciplinar baseado em evidências científicas, esta pode auxiliar na identificação com maior grau de confiança das doenças com maior importância na conservação do lince em Portugal, contextualizando os resultados obtidos nesta ação no possível cenário de reintrodução em solo português, que dificilmente é conseguido apenas com os resultados desta

ação dada a ausência, de entre outros fatores, de populações deste felino em Portugal. Esta análise permitirá, assim, analisar o papel que doenças infecciosas e parasitárias poderão ter na sobrevivência das populações portuguesas de lince, uma vez que não se pode ignorar a importância que estas têm na dinâmica de populações selvagens, mesmo quando se acredita que o principal foco de atenção na problemática da reintrodução do lince seja o restabelecimento de populações da principal presa e a aceitação da população local, como critérios de escolha de uma área de reintrodução.

Se esta vertente das doenças e estes resultados não forem considerados, incorre-se no risco de ocorrer o que se passou com populações de outras espécies em perigo e endémicas, como foi o caso do lobo-etíope, *Canis simensis*, na Etiópia no século XX⁸⁶ ou como foi verificado em projetos de reintrodução de lince euroasiático, *Lynx lynx*, na Suíça onde 19% das mortalidades (13 em 72) foram devidas a processos infecciosos/parasitários⁸⁷.

Com este recurso e através da identificação de doenças que podem ser introduzidas nas futuras populações de lince em Portugal e a determinação da probabilidade de introdução/contato com o agente e subsequentemente avaliação da magnitude das suas consequências, novas medidas que possam mitigar estas probabilidades ou magnitudes são facilmente identificadas e passíveis de serem implementadas, caso seja necessário, salvaguardando todo o processo de reintrodução e potenciando o seu sucesso a curto e possivelmente a longo prazo.

⁸⁶Sillero-Zubiri, C.; King, A. A. & Macdonald, D. W. (1996). Rabies and mortality in Ethiopian wolves (*Canis simensis*). *Journal of Wildlife Diseases* 32(1), 80-86.

⁸⁷Schmidt-Posthaus, H.; Breitenmoser-Wursten, C.; Posthaus, H.; Bacciarini, L. & Breitenmoser, U. (2002). Causes of mortality in reintroduced Eurasian lynx in Switzerland. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), 84-92.

7 Lista de símbolos e abreviaturas

Ac	Anticorpos
ACC	Atividade anti-complemento
Ag	Antigénio
bact	Bactéria
χ^2	Chi-quadrado
CDV	Canine Distemper Virus (Vírus da Esgana)
CEVDI	Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac
conv	Convencional
CoV	Coronavirus
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
ELISA	Enzyme linked immuno-sorbent assay
EV	Endovenosa
FC	Fixação de Complemento
FCV	Feline Calicivirus (Calicivirus felino)
FelV	Feline Leukemia vírus (Vírus da Leucemia felina)
FHV	Feline Herpesvirus (Herpesvirus felino)
FIV	Feline Immunodeficiency vírus (Virus da Imunodeficiência felina)
G	Gauges
g.l.	Graus de liberdade
IC	Intervalo de Confiança
ICNF	Instituto de Conservação da Natureza e Florestas
IM	Intramuscular
Is	Isolamento
IUCN	International Union for Conservation of Nature
I	Leptospira
LL	Aglutinação lenta em lâmina
n	Amostra
N.d.	Não determinado
na	Não aplicável
p	Probabilidade
Pa	Prevalência Aparente
PCEDA	Plano de Controlo e Erradicação da Doença de Aujeszky
PCR	Polymerase chain-reaction (Reação de polimerase em cadeia)
PEBPR	Programa de Erradicação da Brucelose dos Pequenos Ruminantes
PEVBB	Programa de Erradicação e Vigilância da Brucelose Bovina
PEVTB	Programa de Erradicação e Vigilância da Tuberculose Bovina
PR	Prevalência Real
PV	Parvovirus
RB	Rosa Bengala
RL	Aglutinação rápida em lâmina
RT-PCR	Reverse Transcription PCR (Transcriptase reversa)
SC	Subcutânea
T.R.C.	Tempo de repleção capilar

UE	Universidade de Évora
UI	Unidades Internacionais
v	Vírus

8 Índice de tabelas, mapas e figuras

Tabelas

Tabela 1: Grupos em estudo	6
Tabela 2: Doenças, Prioridades, Impacto e Grupos em estudo	6
Tabela 3: Amostragem por área no decurso do Projeto	14
Tabela 4: Espécies amostradas no decurso do Projeto	17
Tabela 5: Tipos de amostras recolhidas por grupo	18
Tabela 6: Amostragem efetuada para Imunodeficiência felina	20
Tabela 7: Prevalências de anticorpos anti-FIV nos grupos em estudo	20
Tabela 8: Prevalências de anticorpos anti-FIV nas áreas e grupos em estudo	20
Tabela 9: Amostragem efetuada para Leucemia felina	21
Tabela 10: Prevalência do antigénio p27 de FeLV nos grupos em estudo	21
Tabela 11: Prevalências de antigénio p27 de FeLV nas áreas e grupos em estudo	22
Tabela 12: Amostragem efetuada para Panleucopénia felina e Parvovirose canina ...	23
Tabela 13: Prevalência de exposição a Parvovirus nos grupos em estudo	23
Tabela 14: Prevalências de exposição a Parvovirus nas áreas e grupos em estudo	23
Tabela 15: Amostragem efetuada para Esgana	24
Tabela 16: Prevalências de exposição ao vírus da Esgana nos grupos em estudo	25
Tabela 17: Prevalências de exposição ao vírus da Esgana nas áreas e grupos em estudo	25
Tabela 18: Amostragem efetuada para Coronavíruses	26
Tabela 19: Prevalências de exposição a Coronavirus nos grupos em estudo	27
Tabela 20: Prevalências de exposição a Coronavirus nas áreas e grupos em estudo ...	27
Tabela 21: Amostragem efetuada para Calicivirose felina	28
Tabela 22: Prevalências de exposição ao Calicivirus nos grupos em estudo	28
Tabela 23: Prevalências de exposição ao Calicivirus nas áreas e grupos em estudo	29
Tabela 24: Amostragem efetuada para Doença de Aujeszky	30
Tabela 25: Prevalências de exposição ao vírus da Doença de Aujeszky nos grupos em estudo	30
Tabela 26: Prevalências de exposição ao vírus da Doença de Aujeszky nas áreas e grupos em estudo	30
Tabela 27: Prevalências de anticorpos anti-herpesvirus suíno em espécies domésticas	31
Tabela 28: Prevalências para a presença de anticorpos para a Doença de Aujeszky nas áreas e grupos de ungulados domésticos em estudo	31
Tabela 29: Amostragem efetuada para Tuberculose	32
Tabela 30: Prevalências de exposição a micobactérias do complexo da Tuberculose nos grupos em estudo neste projeto	32
Tabela 31: Prevalências de exposição aos agentes da Tuberculose nas áreas e grupos em estudo neste projeto	32
Tabela 32: Prevalências de exposição aos agentes da Tuberculose nas espécies domésticas	33
Tabela 33: Prevalências para a presença do agente da Tuberculose nas áreas e grupo dos ungulados domésticos em estudo	33
Tabela 34: Amostragem efetuada para Cytauxzoonose	34
Tabela 35: Prevalências de exposição ao <i>Cytauxzoon felis</i> nos grupos em estudo	35
Tabela 36: Prevalências de exposição ao <i>Cytauxzoon felis</i> nas áreas e grupos em estudo	35
Tabela 37: Amostragem efetuada para Rinotraqueíte felina	36
Tabela 38: Prevalências de exposição ao Herpesvirus felino-1 nos grupos em estudo ...	36

Tabela 39: Prevalências de exposição ao Herpesvirus felino-1 nas áreas e grupos em estudo.....	36
Tabela 40: Amostragem efetuada para Leptospirose.....	37
Tabela 41: Prevalências totais de exposição a Leptospiras nas três áreas e grupos em estudo.....	38
Tabela 42: Prevalências de exposição a Leptospiras nas áreas e grupos em estudo	38
Tabela 43: Serovares identificados	39
Tabela 44: Amostragem efetuada para Brucelose.....	40
Tabela 45: Prevalências de exposição a <i>Brucella</i> sp. nos grupos e no total das três áreas	40
Tabela 46: Prevalências de exposição a <i>Brucella</i> sp. nas áreas e grupos em estudo	41
Tabela 47: Prevalências de exposição a <i>Brucella</i> sp. em espécies domésticas	42
Tabela 48: Prevalências para presença do agente da Brucelose nas áreas e grupos dos ungulados domésticos em estudo.....	42
Tabela 49: Amostragem efetuada para <i>Pasteurella</i> sp.....	43
Tabela 50: Prevalências para isolamento de <i>Pasteurella</i> sp. nos grupos em estudo	43
Tabela 51: Prevalências para isolamento de <i>Pasteurella</i> sp. nas áreas e grupos em estudo.....	43
Tabela 52: Amostragem efetuada para Clamidiose felina	44
Tabela 53: Prevalências de exposição a <i>Chlamydophila felis</i> nos grupos em estudo	44
Tabela 54: Prevalências de exposição a <i>Chlamydophila felis</i> nas áreas e grupos em estudo.....	45
Tabela 55: Amostragem efetuada para Tularémia.....	46
Tabela 56: Prevalências de exposição a <i>Francisella tularensis</i> nos grupos em estudo	46
Tabela 57: Prevalências de exposição a <i>Francisella tularensis</i> nas áreas e grupos em estudo.....	46
Tabela 58: Amostragem efetuada para Coccidiose.....	47
Tabela 59: Prevalências para a presença de Coccídeas em amostras dos grupos em estudo.....	48
Tabela 60: Prevalências para a presença de Coccídeas nas amostras processadas por áreas e grupos em estudo	48
Tabela 61: Amostragem efetuada para Toxoplasmose	49
Tabela 62: Prevalências de exposição a <i>Toxoplasma gondii</i> nos grupos em estudo.....	49
Tabela 63: Prevalências de exposição a <i>Toxoplasma gondii</i> nas áreas e grupos em estudo.....	49
Tabela 64: Amostragem efetuada para Leishmaniose	50
Tabela 65: Prevalências de exposição a <i>Leishmania infantum</i> nos grupos em estudo ...	51
Tabela 66: Prevalências de exposição a <i>Leishmania infantum</i> nas áreas e grupos em estudo.....	51
Tabela 67: Amostragem efetuada para Paratuberculose.....	53
Tabela 68: Prevalências de anticorpos anti-M. <i>paratuberculosis</i> nos grupos em estudo	54
Tabela 69: Prevalências de anticorpos anti-M. <i>paratuberculosis</i> nas áreas e grupos em estudo.....	54
Tabela 70: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 1 - Moura-Barrancos	56
Tabela 71: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 1 - Vale do Guadiana	57
Tabela 72: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 1 - Serra do Caldeirão	57
Tabela 73: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 1 -Total	58

Tabela 74: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 2 - Moura-Barrancos	58
Tabela 75: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 2 - Vale do Guadiana	59
Tabela 76: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 2 - Serra do Caldeirão	59
Tabela 77: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 2 -Total	59
Tabela 78: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 3 - Moura-Barrancos	60
Tabela 79: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 3 - Vale do Guadiana	60
Tabela 80: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 3 - Serra do Caldeirão	61
Tabela 81: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 3 -Total	61
Tabela 82: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 4 - Moura-Barrancos	62
Tabela 83: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 4 - Vale do Guadiana	62
Tabela 84: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 4 - Serra do Caldeirão	63
Tabela 85: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 4 -Total	63
Tabela 86: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 5 - Moura-Barrancos	64
Tabela 87: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 5 - Vale do Guadiana	64
Tabela 88: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 5 - Serra do Caldeirão	64
Tabela 89: Doenças por ordem decrescente de prevalência para o Grupo 5 -Total	64

Mapas

Mapa 1: Freguesias dos Concelhos abrangidos pelo Projeto ou limítrofes das 3 áreas em estudo.....	5
Mapa 2: Detalhe das três áreas em estudo e freguesias amostradas incluindo as exteriores à zona tampão	6
Mapa 3: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados	15
Mapa 4: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 1	15
Mapa 5: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 2	15
Mapa 6: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 3	16
Mapa 7: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 4	16
Mapa 8: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 5	16
Mapa 9: Distribuição por freguesias do número de animais amostrados do Grupo 6	16
Mapa 10: Freguesias testadas para a presença de anticorpos anti-FIV	21
Mapa 11: Freguesias testadas para a presença do antigénio p27	22
Mapa 12: Freguesias testadas para a presença de anticorpos ou material genético de Parvovirus	24
Mapa 13: Freguesias testadas para a presença de material genético do vírus da Esgana ou anticorpos	26
Mapa 14: Freguesias testadas para a presença de material genético de Coronavírus e/ou anticorpos anti-Coronavírus	28
Mapa 15: Freguesias testadas para a presença de material genético de Calicivirus felino	29

Mapa 16: Freguesias testadas para a presença de material genético e/ou anticorpos anti-herpesvirus suíno em populações selvagens	31
Mapa 17: Freguesias testadas no âmbito do PCEDA	31
Mapa 18: Freguesias testadas para isolamento de bactérias do complexo da Tuberculose em populações selvagens.....	34
Mapa 19: Freguesias testadas no âmbito do PEVTB	34
Mapa 20: Freguesias testadas para a presença de <i>Cytauxzoon felis</i>	35
Mapa 21: Freguesias testadas para a presença de FHV	37
Mapa 22: Freguesias testadas para isolamento de leptospiros ou presença de anticorpos anti-leptospira	39
Mapa 23: Freguesias testadas para a presença de bactérias do género <i>Brucella</i> e/ou anticorpos.....	42
Mapa 24: Freguesias testadas no âmbito do PEVBB.....	42
Mapa 25: Freguesias testadas no âmbito do PEBPR	42
Mapa 26: Freguesias testadas para isolamento de <i>Pasteurella Haemolytica</i>	44
Mapa 27: Freguesias testadas para presença de material genético da Clamidiose	45
Mapa 28: Freguesias testadas para a presença deste agente infeccioso	47
Mapa 29: Freguesias testadas para a presença deste grupo de parasitas.....	48
Mapa 30: Freguesias testadas para exposição a <i>Toxoplasma gondii</i>	50
Mapa 31: Freguesias testadas para a presença ou exposição a este hemoparasita	52
Mapa 32: Distribuição por freguesia dos vetores amostrados e locais de origem dos positivos aos ensaios em análise	53
Mapa 33: Freguesias testadas para o agente da Paratuberculose.....	54

Figuras

Figura 1: Armadilha Tomahawk de duas entradas.	9
Figura 2: Caixa Armadilha de uma entrada.	9
Figura 3: Armadilha abrigada das condições ambientais com recurso a vegetação local e placas de cortiça.....	10
Figura 4: Manipulação e monitorização anestésica de um felídeo.....	10
Figura 5: Instalações de uma matilha.	10
Figura 6: Cães de uma das matilhas amostradas.	10
Figura 7: Recolha de sangue da veia cefálica numa gineta capturada.....	11
Figura 8: Manipulação e monitorização anestésica.....	11
Figura 9: Zaragatoas obtidas de uma gineta capturada	12
Figura 10: Exame do estado geral, determinação de idade e obtenção de várias biometrias numa gineta	12
Figura 11: Collarum em utilização, apenas o isco se destaca do solo	12
Figura 12: Recolha de sangue por punção cardíaca numa raposa caçada	12
Figura 13: Carnívoro selvagem atropelado.....	12
Figura 14: Recolha de um texugo morto por atropelamento	12
Figura 15: Montaria	13
Figura 16: Sherman em utilização	13

9 Anexos

Anexo I - Protocolo de imobilização química e manipulação de carnívoros selvagens da Pygargus

Anexo II - Metodologia Tuberculose

Anexo III - Mapas de percentagens de positividade