

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**ESTUDO DAS PARASITOSSES GASTROINTESTINAIS E
PESQUISA DE *NEOSPORA CANINUM* E *TOXOPLASMA GONDII*
POR TÉCNICA DA PCR DO COELHO-BRAVO (*ORYCTOLAGUS
CUNICULUS*) DA ILHA DE S. JORGE**

Maria Raquel Rodrigues Macedo

Orientador: Dr. **Armando José da Silva Lemos**

Porto 2012

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**ESTUDO DAS PARASIToses GASTROINTESTINAIS E
PESQUISA DE *NEOSPORA CANINUM* E *TOXOPLASMA GONDII*
POR TÉCNICA DA PCR DO COELHO-BRAVO (*ORYCTOLAGUS
CUNICULUS*) DA ILHA DE S. JORGE**

Maria Raquel Rodrigues Macedo

Orientador: Dr. **Armando José da Silva Lemos**

Porto 2012

Resumo:

Este estágio teve como principal objectivo, avaliar a presença de parasitas gastrointestinais e dos protozoários *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em coelhos selvagens em locais de pastoreio, na ilha de S. Jorge. Este estudo pode contribuir:

- a) Para identificar o impacto da prevalência destes parasitas;
- b) Definir estratégias para a protecção desta espécie atendendo à sua posição na cadeia trófica;
- c) Para o conhecimento da epidemiologia da toxoplasmose humana;
- d) Avaliar o impacto que o *N. caninum* nos coelhos possa ter na neosporose bovina.

Foram recolhidos 100 cadáveres de animais abatidos a tiro, posteriormente conservados por congelação. Durante a necrópsia, foi recolhido separadamente o conteúdo gástrico e intestinal sendo cada uma das amostras sujeitas a exame macroscópico e exame de flutuação pela técnica de Willis para a identificação e recolha de parasitas adultos ou proglótides e identificação de ovos de nemátodes ou oocistos de protozoários. Foram detectados três espécies de nemátodes, *Graphidium strigosum*, *Passalurus ambiguus* e *Trichostrongylus retortaeformis*, duas espécies de céstodes, *Cittotaenia denticulata* e *C. pectinata* e sete espécies de *Eimeria spp.* Os resultados obtidos indicam que a prevalência do *G. strigosum* é significativamente diferente para a zona de captura, o sexo bem como o índice de gordura renal. Para os céstodes foi também detectada diferença significativa com o sexo dos coelhos. Para algumas das espécies de *Eimeria spp.*, encontrou-se uma diferença significativa para a data da captura e o estado nutricional do animal.

Foi também iniciada a investigação da participação do coelho-bravo na epidemiologia da neosporose e da toxoplasmose. Para tal, foi extraído DNA do cérebro de 24 coelhos e posteriormente submetidos à técnica da PCR, tendo até ao momento, sido analisadas 10 amostras. Até à data, não foi possível iniciar o protocolo para detecção do *Toxoplasma gondii*, ainda que a sua importância seja descrita durante o relatório.

Agradecimentos:

Começo por agradecer ao professor Dr. Armando Lemos, que desde o início se mostrou disponível e sem o qual seria impossível realizar este projecto.

Um agradecimento à Direcção Regional dos Recursos Florestais e ao Serviço Florestal de São Jorge, em especial à Engenheira Carla Moutinho e à Engenheira Sara Cabeceiras.

Agradeço também ao CIBIO, em particular ao Professor Doutor Paulo Célio Alves, ao Professor Doutor David Gonçalves e ao Tiago Rodrigues.

Um agradecimento aos caçadores que contribuíram para este estudo

Um agradecimento especial ao Dr. Rodolfo Silva, quer pela sua inestimável ajuda técnica quer pelo companheirismo.

Não posso deixar de mencionar a ajuda prestada pelo Sr. Duarte Monteiro no processamento das amostras.

À professora Doutora Maria Berta de Jesus Duarte da Silva pela amabilidade na cedência do material para a realização da extracção de DNA e técnica da PCR. Um obrigada à Dra. Cláudia Carvalho e restantes profissionais do laboratório de Imunogenética, que sempre se mostraram disponíveis.

Agradeço ao Professor Doutor António Mira da Fonseca pelo apoio na execução da análise estatística.

Para finalizar, um muito obrigada a todos os que me auxiliaram nesta viagem pelos novos caminhos da ciência...

ÍNDICE:

Resumo	iii
Agradecimentos	iv
Índice	v
1.Introdução	1
1.a) O coelho bravo	1
1.b) <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i>	3
1.c) Região da Macaronésia	5
1.d) Enquadramento do estudo	6
2. Material e métodos	6
2.a) Área de estudo	6
2.b) Amostras	7
2.c) Análise coprológica	8
2.d) Extracção de DNA e técnica da PCR	8
3. Resultados	9
3.a) Análise macroscópica	9
3.b) Análise microscópica	10
3.c) Resultados da electroforese	12
3.d) Análise estatística	13
4. Discussão dos resultados	14
5. Conclusão	18
6. Referências bibliográficas	20
7. Anexos	26

1. Introdução:

1.a) O coelho-bravo:

O *Oryctolagus cuniculus* tem uma origem ibérica, e uma vasta distribuição, compreendendo quase toda a Europa, com excepção das regiões da Rússia e da Escandinávia. Este pequeno mamífero pertence à ordem Lagomorpha e à Família Leporidae, dividindo-se actualmente em duas sub-espécies morfológica e geneticamente distintas: *O. cuniculus cuniculus*, distribuída pelo nordeste de Espanha, Sul de França, Europa Ocidental e Austrália, e *O. cuniculus algirus*, mais pequena, que ocorre no sudoeste da Península Ibérica, Açores e Madeira (Blasco *et al.* 1996; Fonseca 2006). O coelho-bravo está presente em todas as ilhas dos Açores, com excepção da ilha do Corvo (Mathias *et al.* 1998).

O coelho selvagem é um animal fundamentalmente gregário cuja estrutura social base consiste num grupo familiar de 2 a 10 indivíduos. O território é defendido principalmente pelo macho dominante, que assume 80 a 100% das actividades de defesa e vigilância (Carlos 1997). Apesar de os coelhos depositarem excrementos por todo o seu domínio vital, estes animais formam agrupamentos de excrementos (latrinas) que são usadas quer como marcação do território quer como centro de informação social. Os machos são os principais responsáveis pela manutenção das latrinas onde, para além de excrementos, depositam secreções das glândulas anais e submandibulares e urina (Sneddon 1991).

O estudo de parasitas em animais selvagens é de vital importância não apenas por poderem levar ao seu decréscimo, mas também pela possibilidade da sua transmissão a outros hospedeiros selvagens, a animais domésticos e mesmo ao homem, conduzindo a efeitos económicos e sanitários negativos. Este problema tem ainda maior expressão quando falamos de espécies cinegéticas com um interesse recreativo e turístico. (Molina *et al.* 1998)

Embora os seus efeitos negativos sobre a flora nativa estejam muito bem referenciados nas Canárias, há desconhecimento dos seus reais efeitos ao nível da flora nativa dos Açores (Silva 2008). Nos Açores, é necessário por vezes prolongar os períodos de caça devido à densidade elevada da espécie. Esta alta carga animal é devida a vários factores: as condições climáticas favoráveis, a disponibilidade de alimentos (fruto da actividade pecuária), a escassez de predadores naturais – que nos Açores resumem-se à águia de asas redonda, o furão, a doninha, o bufo pequeno, o rato

(Carvalho & Almeida 1990) e animais errantes – assim como a existência de uma barreira sanitária formada pelo oceano Atlântico. Por este facto, os Serviços Florestais mantêm sobre esta espécie uma rede de observação e controlo, com vista à determinação cíclica dos níveis populacionais e a sua variabilidade ao longo do tempo. As situações verificadas são díspares de ilha para ilha, assim como poderão ser significativamente diferentes de um ano para o outro.

O coelho bravo é hospedeiro de diferentes tipos de parasitas, como protozoários, helmintes e artrópodes.

Os protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia e sobretudo à Família Eimeridae e ao Género *Eimeria*, são os principais responsáveis pelas coccidioses neste animal. São parasitas intracelulares obrigatórios, com ciclo de vida monoxeno e elevada especificidade para o hospedeiro e, até ao momento, encontram-se identificadas e descritas 11 espécies de *Eimeria spp.* no coelho, sendo a *E. stiedai* a única que invade o fígado e ductos biliares com as restantes a parasitar o tracto intestinal (Bhat *et al.* 1996; Courdert *et al.* 1995). É difícil determinar quais as espécies envolvidas na doença, existindo unanimidade sobre a baixa patogenicidade da *E. perforans*. Segundo Pakandl *et al.* (1996), a *E. magna* é a coccídea mais comum nos coelhos e a *E. irresidua* é provavelmente a que menos surge (Jelínková *et al.* 2008). As espécies de coccídeas intestinais podem ser agrupadas em três tipos, segundo parâmetros clínicos como perda de peso, diarreia e mortalidade: apatogénicas a ligeiramente patogénicas (*E. media*, *E. exígua*, *E. perforans*, *E. coecicola*), moderadamente patogénicas (*E. irresidua*, *E. magna*, *E. piriformis*) e muito patogénicas (*E. intestinalis*, *E. flavescens*) (Bhat *et al.* 1996). Os gametócitos de *E. flavescens* destroem as criptas do ceco podendo provocar diarreia intensa. Em casos de infecção por espécies com esquizogonia/merogonia de localização subepitelial (*E. media*, *E. irresidua*, *E. flavescens*) há uma rotura dos vasos capilares, causando a presença de petéquias e/ou equimoses na mucosa.

Alguns dos outros protozoários também referidos como parasitas do coelho selvagem incluem o *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis spp.*, *Trypanossoma nabiasi*, *Lambliia duodenalis*, *Neospora caninum* e *Encephalitozoon spp.*

Os helmintes mais comuns do coelho-bravo pertencem às classes Nematoda e Cestoda. Dos nemátodes, é de salientar o *Passalurus ambiguus*, o *Graphidium strigosum* e o *Trichostrongylus retortaeformis*. O *P. ambiguus* é um oxirurídeo com distribuição mundial e o parasita adulto localiza-se no ceco e cólon dos hospedeiros. A

tricostrongilose é um processo parasitário que afecta principalmente os coelhos selvagens, sendo caracterizado pela presença de *G. strigosum* e *T. retortaeformis* na mucosa gástrica e duodenal, respectivamente.

Encontra-se também referenciada a existência, na ilha da Madeira, dos nemátodes *Trichuris leporis* e *Dermatoxys hispaniensis* (Foronda *et al.* 2003). Devido às semelhanças bioclimáticas da Macaronésia com a região mediterrânica, era expectável a presença do *Nematodiroides zembrae* na Península Ibérica mas tal não se verifica (Blasco *et al.* 1996).

Os céstodes que parasitam, na forma adulta, o intestino do coelho pertencem à Família Anoplocephalidae, que contém dois géneros – *Cittotaenia* e *Andrya* – específicos de roedores e lagomorfos e o género – *Paranoplocephala* – com duas espécies em coelhos.

O coelho actua também como hospedeiro intermediário e reservatório de formas larvares de céstodes do cão e outros carnívoros: *Cysticercus pisiformis* e *Coenurus serialis* (formas larvares da *Taenia pisiformis* e *Taenia serialis* respectivamente). A primeira tem uma localização peritoneal, sendo que a patogenia deve-se à migração hepática das larvas, cujos trajectos lesionam o parênquima hepático. Já a segunda tem uma localização muscular e subcutânea e a patogenia é devida, principalmente, à acção compressiva dos quistos dependendo assim da sua localização. A prática comum dos caçadores de permitirem a ingestão pelos cães das vísceras dos animais contribui para uma infecção e propagação destes parasitas. (Whitlock 1939)

Esta espécie é também um hospedeiro natural dos tremátodes *Fasciola hepatica* (mais comum em áreas de pastoreio com ruminantes infectados (Schoeb 2007)) e *Dicrocoelium dendriticum*, embora as infecções por eles provocadas sejam geralmente subclínicas.

1.b) *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*:

O *Toxoplasma gondii* e o *Neospora caninum* são protozoários intracelulares com morfologia semelhante mas biologicamente distintos. Apresentam uma distribuição a nível mundial, estando relacionados com episódios de aborto e doenças reprodutivas em gado bovino (Dubey & Schares 2006).

O *T. gondii* é um agente zoonótico que infecta a maioria dos animais de sangue-quente, sendo os felídeos os únicos hospedeiros definitivos. Ele é geralmente apatogénico sendo os casos de doença restritos a períodos de imunossupressão, como a

gestação. As ovelhas são particularmente susceptíveis e a infecção leva a aborto (Williams *et al.* 2004). Estudos demonstraram que os efeitos de uma infecção congénita variam muito e são influenciados pelo tempo de gestação em que ocorreu (Hartley 1961).

Ainda que alguns autores (Beverley *et al.* 1954) tenham detectado altos títulos de anticorpos anti-toxoplasma em caçadores de coelhos, não existem estudos epidemiológicos sobre o grau de correlação entre a prevalência de toxoplasmose em coelhos e nos humanos que mantêm contacto com esses animais (Sroka *et al.* 2003).

O *Neospora caninum* é actualmente considerado como um dos principais responsáveis de aborto em bovinos de leite e animais de produção de carne, com um impacto económico significativo na indústria. Em Portugal, o diagnóstico da neosporose bovina, relacionado com a ocorrência de abortos, foi inicialmente referida em 2001, seguindo-se o isolamento do agente em 2002 (Thompson *et al.* 2001; Canada *et al.* 2002a). Este parasita infecta um amplo espectro de mamíferos domésticos e selvagens, apesar do seu hospedeiro definitivo serem os canídeos. Os oocistos são a chave na epidemiologia da neosporose mas raramente são identificados, visto que são libertados em baixo número pelos canídeos.

A presença de coelhos em locais de pastoreio pode ser tido como um factor de risco para a infecção por *N. caninum*, visto que foi recentemente descrito um ciclo de transmissão silvático, mantido entre cães e animais silvestres. Especula-se que a caça possa favorecer esta via, através da prática de evisceração ao ar livre com a infecção do cão pela ingestão dos tecidos contaminados (Gondim 2006). Teoricamente, qualquer tecido animal contaminado com quistos de *N. caninum* pode ser uma fonte de infecção para os canídeos, sendo que só está demonstrada a presença de quistos em tecido muscular e neuronal.

Apesar de vários estudos referirem uma panóplia de animais domésticos e selvagens expostos ao *Neospora caninum*, poucos são aqueles de onde foi possível isolar com êxito o agente. Foi demonstrado que cães alimentados com tecidos provenientes de bovinos neonatos infectados, não eliminavam oocistos nas fezes, talvez porque o *N. caninum* morresse juntamente como o tecido do hospedeiro (Cedillo *et al.* 2008).

Até ao ano de 2002, foram detectados surtos de abortos por *Neospora caninum* com resultados positivos à serologia e confirmados por diagnóstico parasitológico em vacarias do Norte e Centro do país, assim como nos Açores (Canada *et al.* 2002b).

Nos últimos anos, o diagnóstico de neosporose e toxoplasmose foi otimizado pela introdução dos testes da PCR (*polymerase chain reaction*), que permitem uma identificação mais rápida e mais sensível, através da amplificação e subsequente demonstração de sequências específicas do DNA (*deoxyribonucleic acid*) do parasita (Lally *et al.* 1996).

A imuno-histoquímica é utilizada não só para aumentar a probabilidade de detecção do agente, como para diagnóstico diferencial de outros parasitas da mesma família, como o *T. gondii*. No entanto, apesar de ser considerada uma técnica de referência em termos de especificidade, a sua sensibilidade é relativamente baixa, sendo por isso aconselhável a realização de múltiplos cortes. O uso da técnica da PCR com amplificação de regiões genómicas de carácter repetitivo, como do gene Nc5, permite aumentar a sensibilidade da detecção do *Neospora caninum* (Baszler *et al.* 1999) para além de que este gene não existe no genoma do *T. gondii*, *S. cruzi* e *H. hammondi*, o que permite um diagnóstico fidedigno. Apesar de existirem vários pares de primers, mais recentemente tem-se recorrido ao uso dos primers Np6plus e Np21plus (Müller *et al.* 2001) em combinação com os primers Np6 e Np7 (Baszler *et al.* 1999; Yamage *et al.* 1996) num two-step nested PCR

A sensibilidade e especificidade do diagnóstico depende, para além do DNA-alvo e primers, de um protocolo adequado visando a correcta extracção e purificação do DNA, o uso dos reagentes certos para a PCR, a programação do termociclador e a análise dos fragmentos de DNA amplificados.

1.c) A região da Macaronésia:

A região da Macaronésia é constituída por 4 arquipélagos: Açores, Madeira, Canárias e Cabo Verde, todos de origem vulcânica. Uma das características mais importante na altura de definir a singularidade do biótipo da Macaronésia, e comum aos arquipélagos que a comportam, é o factor insular. O isolamento provocado por tal factor, desencadeou uma série de processos evolutivos que proporcionou a diferenciação das espécies, dando lugar a uma grande variedade dentro das distintas áreas geográficas, quer sejam arquipélagos, ilhas ou localidades concretas.

1.d) Enquadramento do estudo:

Os animais utilizados para este estudo foram recolhidos no âmbito do programa “Monitorização das populações de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) no arquipélago dos Açores”, da Direcção Regional dos Recursos Florestais (DRRF, Açores) com a colaboração do CIBIO (Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto) e o Serviço Florestal de São Jorge. Este programa contou ainda com a colaboração especial da Engenheira Carla Moutinho, da Engenheira Sara Cabeceiras, do Tiago Rodrigues (CIBIO) bem como de alguns caçadores da ilha de São Jorge.

2. Material e Métodos:

2.a) Área de estudo:

Nos Açores, a temperatura média anual ao nível do mar é de 17°C, diminuindo cerca de 0,6°C por cada 100 m de aumento de altitude. A pluviosidade aumenta com a altitude e de Este para Oeste, chegando a atingir os 30000 mm por ano. A humidade relativa do ar é elevada, aumentando igualmente com a altitude, com um valor médio anual de 76% atingindo o máximo em Dezembro e o mínimo em Julho/Agosto. Em termos gerais, ainda que se observe uma variação das condições climatéricas no arquipélago e uma variação espacial significativa dentro de cada ilha, o seu clima pode ser classificado de mesotérmico húmido com características oceânicas. (Azevedo 2001).

A ilha de S. Jorge pertence ao grupo central do arquipélago dos Açores e está situada a 28° 33' de longitude oeste e a 38° 24' de latitude norte. Esta ilha é atravessada por uma cordilheira montanhosa que atinge a altitude máxima de 1053 metros, no Pico da Esperança. A costa é em geral rochosa, com arribas altas e escarpadas. A diferença entre os relevos a oeste e a este permite individualizar duas regiões distintas, a Região Ocidental e a Região Oriental, separadas, grosso modo, pelo vale da Ribeira Seca. Uma actividade vulcânica mais intensa foi determinante para que no centro e na parte oriental desta região se observem as maiores altitudes.

A sua situação climatérica resulta da influência do Bordo ocidental do Anticiclone dos Açores, aliada aos factores fisiográficos locais, ao revestimento e natureza do solo e à proximidade do mar (Carvalho *et al.* 1992).

Segundo o relatório climatológico anual de 2011 do Instituto de Meteorologia, no arquipélago dos Açores os valores médios da temperatura média máxima, média e mínima do ar foram superiores aos valores normais (1971-2000). Os valores da quantidade de precipitação anual foram inferiores aos valores normais.

2.b) Amostras:

Os animais usados neste estudo foram capturados em quatro localidades: Rosais, Urzelina, Nortes e Topo.

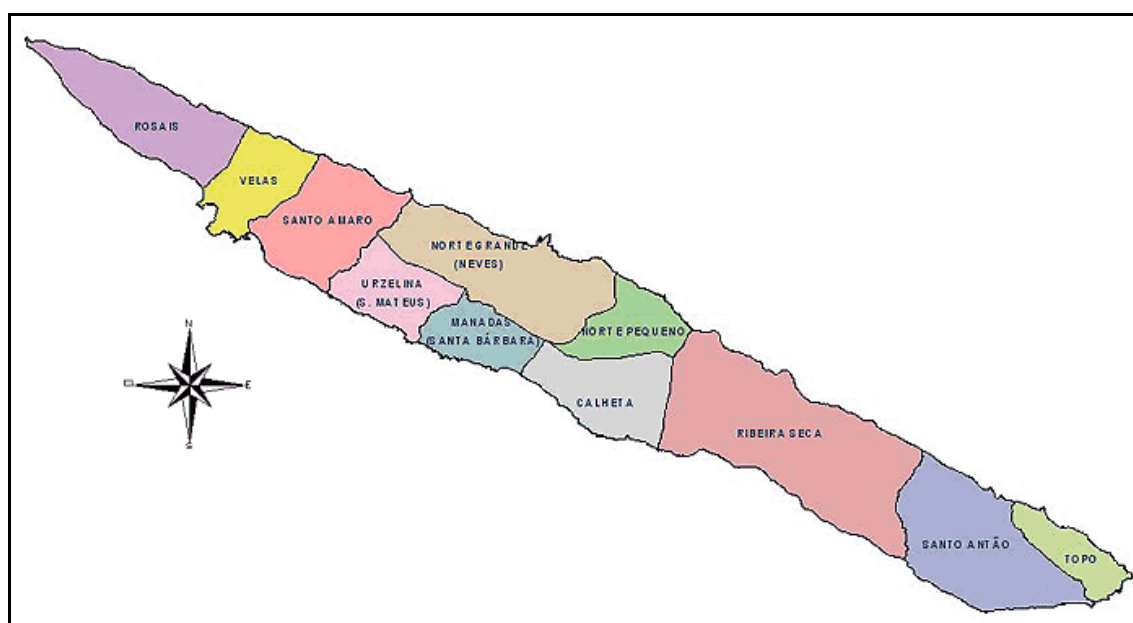


Figura 1. Distribuição da amostragem na ilha de São Jorge (Fonte: Carta Administrativa de Portugal, Instituto Geográfico Português).

Os coelhos analisados (total de 100 animais) foram abatidos a tiro entre Setembro de 2011 e Janeiro de 2012. Os animais foram pesados, sexados, foi estimada a idade com base no peso corporal e no peso do cristalino e foi também determinado o estado reprodutivo dos machos e fêmeas. O índice de gordura renal (IGR) foi estimado com base na quantidade de gordura a envolver os rins onde temos: 0 – sem gordura, 1- com alguma gordura, 2- com muita gordura e 3- rins praticamente cobertos por gordura, a qual se estendia pela cavidade abdominal.

A congelação foi o método escolhido para conservação dos órgãos até à data da análise laboratorial.

Na Tabela 1 do Anexo estão registadas algumas das características consideradas para este estudo referentes aos animais utilizados neste estudo.

2.c) Análise coprológica:

Procedeu-se à incisão das vísceras abdominais (estômago, intestino delgado e intestino grosso) para pesquisa de parasitas e para recolha de material para ser submetido às técnicas de diagnóstico. As amostras do conteúdo do estômago, do intestino delgado e do intestino grosso foram acondicionadas em recipientes plásticos e conservadas entre 4°-8°C até ao momento da análise laboratorial.

As amostras foram submetidas a análise pelo método de flutuação com solução saturada de sacarose (Foreyt 2001):

1. Para uma solução saturada de sacarose com densidade de 1,20g/cm³ deve-se dissolver 454g de açúcar em 355 ml de água.
2. Suspender 3 gramas de fezes em 50 ml da solução saturada.
3. Filtrar com gaze para um copo de flutuação e colocar uma lamela no topo (durante 20 minutos).
4. Montagem de preparação entre lâmina e lamela para observação ao microscópio óptico e identificação dos ovos e oocistos.

2.d) Extração do DNA e técnica da PCR:

A extração do DNA foi realizada a partir de 25 mg de tecido cerebral homogeneizado usando o *DNeasy Blood & Tissue Kit*[®] (Qiagen[®]) de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração total e qualidade do DNA extraído foram determinadas por espectrofotometria (Nanodrop[®] 1000, Thermo Scientific).

A reacção da PCR realizada foi descrita por Hughes *et al* (2006) com algumas modificações: para um volume final de 50 µl a mistura da reacção continha 5 µl de 10 x PCR buffer, 0,5 mM de MgCl₂, 12,5 µM dNTP's mix, 10 µM de cada primer, 0,5 µl de Taq polimerase (5 U/µL) e 1 µl de ADN a testar ou água (caso do controlo negativo).

Os primers utilizados foram o Np6Plus (5' CTC GCC AGT CAA CCT ACG TCT TCT 3') e o Np21Plus (5' GGG TGT GCG TCC AAT CCT GTA AC 3').

Para a reacção da PCR utilizou-se o TProfessional Basic Thermocycler[®] onde, após o passo inicial para desnaturação durante 5 minutos a 95°C, foram introduzidos 40

ciclos de, 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 63°C, 1 minuto e 40 segundos a 72°C, finalizando com um ciclo de 10 minutos a 72°C.

O produto da PCR foi corrido num gel de Agarose TAE a 1,5%, contendo brometo de etídeo. A concentração utilizada no gel de Agarose foi considerada a ideal para separar os fragmentos de DNA objecto de estudo. A electroforese em gel baseia-se no princípio de que a molécula de DNA, que tem carga negativa em pH neutro, quando aplicada a uma matriz de gel submetida a um campo eléctrico, migra em direcção ao pólo positivo. A velocidade da migração está dependente do tamanho da molécula, por isso moléculas com tamanhos distintos encontram-se em diferentes pontos do gel.

Após a corrida, as bandas no gel são visualizadas com recurso à luz ultravioleta.

3. Resultados:

3.a) Análise macroscópica:

Dos 100 coelhos analisados, 49 apresentavam parasitas adultos no estômago que foram identificados como *Graphidium strigosum* (Figura 2). Eles são nemátodes filiformes de cor avermelhada, com as dimensões a variar entre os 8-16 mm, no macho, e 11-20 mm nas fêmeas.

Ainda que os seguintes parasitas não tenham sido encontrados sabe-se que:

- O *Trichostrongylus retortaeformis* encontra-se na mucosa duodenal, podendo raramente estar no estômago. São esbranquiçados e os machos medem entre 5-6 mm e as fêmeas 8mm;
- O *Passalurus ambiguus* localiza-se no intestino grosso sendo um parasita pequeno, esbranquiçado e corpo flexível. Os machos medem cerca de 4-5 mm e as fêmeas 9-11 mm.

Durante a inspecção do intestino delgado, foram encontradas 39 amostras com céstodes. Após a recolha e observação dos vários espécimens, foi possível identificar, por diferenças morfológicas, duas espécies distintas: a *Cittotaenia denticulata* e a *Cittotaenia pectinata*.

A *C. denticulata* não tem pescoço, já a *C. pectinata* apresenta um pescoço (Figura 3) (Soulsby 1987).

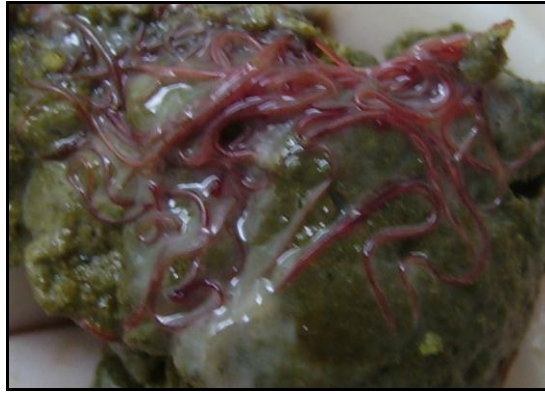


Figura 2. Parasitas adultos de *Graphidium strigosum* presentes no estômago.

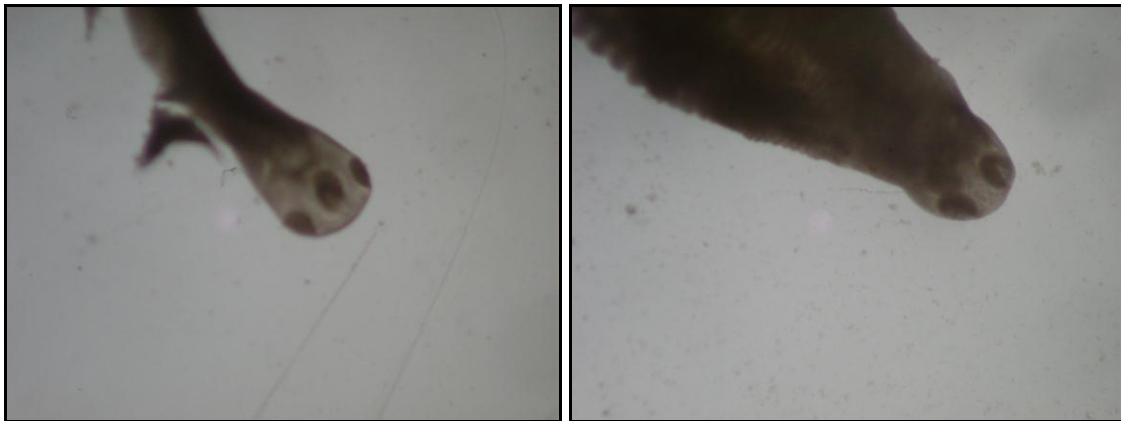


Figura 3. *Cittotaenia pectinata* (esquerda) e *Cittotaenia denticulata* (direita).

3.b) Análise microscópica:

As diferentes espécies de *Eimeria spp.* podem ser diferenciadas através da caracterização dos oocistos (Figuras 4-6). Esta caracterização é feita com base em características como o tamanho, a cor, a forma e a presença ou ausência de micrópilo (Tabela 2 do Anexo). Utilizando as características referidas, identificamos diferentes espécies de *Eimeria spp.* com as prevalências de: *E. media* (31,3%), *E. piriformis* (18,2%), *E. flavescens* (17,2%), *E. coecicola* (3%), *E. magna* (1%), *E. irresiua* (1%) e *E. perforans* (4%).

Os ovos do *Graphidium strigosum* são do tipo estrogilídeos, ovalados e grandes, medindo 98-106 μm de comprimento e 50-58 μm de largura (Figura 7). Podem conter um grande número de blastómeros ou uma larva L₁.

Os ovos de *Trichostrongylus retortaeformis* distinguem-se dos do *G. strigosum* pelas suas menores dimensões: 75-80 μm de comprimento e 40-45 μm de largura. Apresenta uma forma elíptica irregular e uma cápsula delgada, quitinosa e com superfície lisa e podem conter entre 16-32 blastómeros.

O *Passalurus ambiguus* apresenta ovos de tamanho mediano, com 95-103 μm de comprimento e 43-45 μm de largura (figura 9). Ele tem forma ovóide assimétrica com cápsula delgada. (Thienpoint 1989)



Figura 4. *Eimeria perforans* (ampliação 40x).



Figura 5. *Eimeria coecicola* (ampliação 40x).



Figura 6. *Eimeria media* (ampliação 40x).



Figura 7. Ovo de *Graphidium strigosum* com 105 μm de comprimento e 50 μm de largura (ampliação de 40x).



Figura 8. Ovo de céstode (ampliação de 40x).



Figura 9. Ovo de *Passalurus ambiguus*, com 100 μm de comprimento e 37,5 μm de largura. (ampliação de 40x).

3.c) Resultados da electroforese:

Como pode ser observado pelas figuras 10 e 11, não foi possível observar qualquer banda correspondente a fragmentos de DNA, pelo que os resultados obtidos são considerados negativos. Pode-se fazer esta observação, na medida em que o controlo positivo utilizado na mesma PCR, amplificou uma banda com o tamanho esperado. Para permitir uma estimativa do tamanho dos fragmentos de DNA de cada amostra recorreu-se à aplicação, num dos poços, de um marcador de peso molecular (*ladder*). Este resulta de uma mistura de diversos fragmentos de DNA com tamanhos e concentrações conhecidos. Para o nosso protocolo, usando os primers Np6Plus e Np21Plus para amplificação de parte do gene Nc5, é expectável observar um fragmento de ADN com 337 pares de base no produto da PCR.

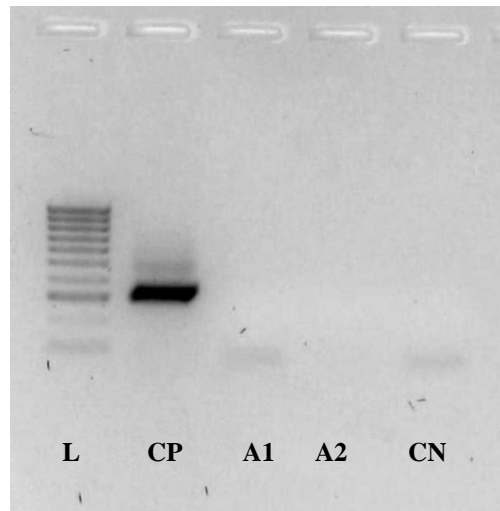


Figura 10. Resultado das amostras para pesquisa de *Neospora caninum*.

L – ladder; CP – controlo positivo; A1 e A2 – amostras; CN – controlo negativo.



Figura 11. Resultado das amostras para pesquisa de *Neospora caninum*.
L – ladder; CP – controle positivo; A3 a A10 – amostras; CN – controle negativo.

3.d) Análise estatística:

As prevalências foram comparadas usando teste χ^2 , (Bush *et al.* 1997) quanto aos efeitos “data da captura”, “localidade”, “sexo”, “IGR” e a presença do parasita.

Parasita	P. geral	Data captura				
		Set. 11	Out. 11	Nov. 11	Dez. 11	Jan.12
<i>G. strigosum</i> adultos	49	63,3	57,7	31,6	31,6	50
Céstodes adultos	41,1	37	40	42,1	38,9	66,7
<i>E. media</i>	31,3	20,7	19,2	63,2	36,8	50
<i>E. piriformis</i>	18,2	3,4	11,5	42,1	26,3	16,7
<i>E. flavescens</i>	17,2	10,3	11,5	42,1	15,8	16,7

Tabela 1. Prevalência (%) dos parasitas relativamente ao mês de captura e prevalência geral (%).

Parasita	P. geral	Localidade			
		Topo	Nortes	Urzelina	Rosais
<i>G. strigosum</i> adultos	49	0	57,9	58,8	62,1
Céstodes adultos	41,1	25	42,1	50	39,3
<i>E. media</i>	31,3	29,4	36,8	35,3	24,1
<i>E. piriformis</i>	18,2	11,8	21,1	11,8	27,6
<i>E. flavescens</i>	17,2	23,5	10,5	8,9	27,6

Tabela 2. Prevalência (%) dos parasitas relativamente à localidade onde foram capturados.

Parasita	P. geral	Sexo		IGR			
		Macho	Fêmea	0	1	2	3
<i>G. strigosum</i> adultos	49	57,9	37,2	68,6	47,5	25	20
Céstodes adultos	41,1	51	27,5	42,9	48,6	25	50
<i>E. media</i>	31,3	35,7	25,6	11,8	47,5	35	20
<i>E. piriformis</i>	18,2	19,6	16,3	11,8	20	20	40
<i>E. flavescens</i>	17,2	20	4,3	8,8	22,5	20	20

Tabela 3. Prevalência (%) dos parasitas relativamente ao sexo e ao IGR.

Podemos verificar que existem diferenças significativas da presença de *G. strigosum* adultos entre os locais de captura ($\chi^2 = 21,19$; $P < 0,05$), o sexo do coelho ($\chi^2 = 4,20$; $P < 0,05$) e o índice de gordura renal ($\chi^2 = 11,69$; $P < 0,05$).

Em relação à presença de ovos de *G. strigosum* nas fezes dos coelhos analisados das diferentes localidades encontramos diferenças significativas ($\chi^2 = 12,54$; $P < 0,05$). É de mencionar que a prevalência de *G. strigosum* (adultos e ovos) é maior em machos do que nas fêmeas.

Para os céstodes adultos recuperados a nível do intestino delgado, encontramos diferenças significativas na prevalência ($\chi^2 = 5,24$; $P < 0,05$), sendo esta maior em machos do que fêmeas.

Referente às coccídeos, encontramos para a *E. media* diferenças significativas em relação à data de captura ($\chi^2 = 12,87$; $P < 0,05$) e o índice de gordura renal dos animais ($\chi^2 = 11,34$; $P < 0,05$), enquanto que para a *E. piriformis* só encontramos diferenças significativas na data de captura ($\chi^2 = 13,17$; $P < 0,05$).

Considerando a *E. flavescens* como uma das *Eimeria spp.* muito patogénicas (Bhat *et al.* 1996), podemos indicar que esta é a menos prevalente (17,2%) entre os diferentes parasitas gastrointestinais mencionados nas tabelas 1,2 e 3. As espécies das restantes *Eimeria spp.* anteriormente referidas não foram consideradas para a análise estatística dada a sua baixa prevalência.

4. Discussão dos resultados:

As diferenças quantitativas e qualitativas observadas nas várias ilhas da Macaronésia são provavelmente devidas a diferentes níveis de adaptação de cada espécie de helminte aos factores bióticos e abióticos característicos de cada região. No presente estudo foram encontradas três espécies de nemátodes (*Graphidium strigosum*, *Trichostrongylus retortaeformis* e *Passalurus ambiguus*), duas espécies de céstodes

(*Cittotaenia pectinata* e *C. denticulata*) e sete espécies de *Eimeria spp.* (*E. media*, *E. magna*, *E. piriformis*, *E. flavescens*, *E. irresidua*, *E. coecicola* e *E. perforans*). No exame microscópico não foram encontrados ovos de tremátodes.

Como foi anteriormente mencionado, o efeito da idade dos animais não foi levada em conta para o estudo das prevalências devido ao baixo número de juvenis capturados (5 no total de 100 animais) o que se conjuga com o conhecimento existente sobre a actividade reprodutiva dos coelhos nas ilhas. Para a ilha das Flores foi determinado que a actividade reprodutiva anual do coelho-bravo aumenta, de forma significativa, a partir de Fevereiro/Março, com uma actividade máxima em Maio. Posteriormente, diminuirá de forma regular até Setembro/Outubro, parecendo existir um abrandamento reprodutivo nos meses de Outono/Inverno (sobretudo de Outubro a Dezembro) (Gonçalves *et al.* 2007).

Vários estudos foram feitos para determinar a influência do sexo do coelho-bravo na fauna helmíntica no entanto apresentam resultados contraditórios. Na pesquisa efectuada por Molina *et al.* (1999), em Espanha, a prevalência de *G. strigosum* era maior em machos. No nosso estudo o resultado obtido é semelhante, sendo uma explicação possível a maior área de acção do macho, em relação à fêmea. Outra razão mencionada por Folstad & Karter (1992) é que a variação dos níveis de testosterona nos machos pode conduzir a maior carga parasitária devido aos factores imuno-supressivos dessa hormona. É também significativa a relação entre este parasita e o local de captura, estando ausente no local do Topo, podendo este valor dever-se à menor densidade de coelhos nesta parte da ilha (Frutuoso 2005).

Algumas das razões que podem justificar a ausência de alguns parasitas gastrointestinais como a *Citottaenia ctenoides*, *Andrya cuniculi* e *Dermatoxys hispaniensis* dos coelhos selvagens da ilha de S. Jorge são: o possível repovoamento com coelhos saudáveis e não parasitados, as variações nas populações do coelho, os efeitos dos factores ambientais e ainda eventuais erros decorrentes do método experimental.

A carga parasitária de *Passalurus ambiguus* e *Trichostrongylus retortaeformis* encontrada foi residual. Uma das explicações para a ausência do *P. ambiguus* pode residir no modo como é feita a sua transmissão: os ovos são depositados na região perianal, dando-se a infecção após ingestão do ovo com L₃, quer pela limpeza, quer por coprofagia.

Segundo o trabalho de Dudzinski *et al.* (1963) realizado na Austrália, o nível de infecção com *G. strigosum* está dependente da idade e sexo dos hospedeiros, sendo menos frequente em animais machos e em jovens. Já no caso do *T. retortaeformis* o mesmo estudo indica uma relação entre a idade e o número de ovos expelidos, sendo essa relação maior em animais mais jovens.

Encontra-se também relatado que, tanto para o *T. retortaeformis* como para o *P. ambiguus* existe uma correlação com a época sazonal: durante a época reprodutiva as fêmeas estavam mais fortemente parasitadas que os machos, uma tendência que se invertia com a aproximação da época não-reprodutiva (Dunsmore *et al.* 1968).

O *T. retortaeformis* é uma espécie geohelminte e a sua presença é condicionada tanto pelos factores bioclimatéricos como pelos mecanismos do sistema imunitário do hospedeiro. A baixa presença deste parasita no nosso estudo pode ter resultado dos efeitos da temperatura e humidade, tendo o ano de 2011 sido mais quente e seco do que o normal.

Quanto ao efeito dos nemátodes, Hobbs *et al* (1999) menciona que não são uma causa importante na mortalidade dos coelhos selvagens embora Lello *et al* (2005) apoie a ideia que eles podem exercer um efeito negativo na condição do hospedeiro. Segundo a análise estatística dos nossos resultados, foi detectada uma diferença significativa da carga parasitária do *G. strigosum* para os índices de gordura renal dos animais, não sendo conhecido se é o efeito dos parasitas que diminui a condição corporal dos coelhos ou se é o pobre estado nutricional que debilita o sistema imunitário, facilitando o parasitismo.

A carga parasitária dos céstodes está relacionada com o sexo, sendo este parasita mais prevalente em machos. Ambos os céstodes apresentam ciclos de vida semelhantes, sendo necessário um hospedeiro intermediário para completarem o ciclo. Estes hospedeiros são ácaros oribatídeos que estão presentes na vegetação. Uma das causas para este resultado pode ser a maior movimentação manifestada pelos machos, quando comparada com a fêmea, havendo assim maior probabilidade para a ingestão do ácaro (que contém o estadio cisticercóide - a forma infectante). Não foi encontrada variação deste parasita com o índice de gordura renal, o que era expectável pois os céstodes encontrados não se alimentam directamente do hospedeiro, mas sim do alimento presente no lúmen intestinal. Ainda assim, é importante mencionar que os céstodes podem levar a uma congestão do aparelho digestivo, pois ocupam grande parte do

intestino delgado do hospedeiro. Tal pode levar à necessidade de mobilização de gordura e diminuir a capacidade de armazenamento da mesma.

A existência de infecções concomitantes pode afectar a susceptibilidade do hospedeiro e a transmissão de parasitas visto que estes interagem quer directa quer indirectamente entre si. No estudo de Boag (1988), foi mostrado um aumento do número de parasitas em coelhos com mixomatose, resultado de uma imunodepressão do hospedeiro provocada pelo vírus. Contrariamente, o estudo de Molina *et al.* (1998) descreve que o *G. strigosum* e o *T. retortiformis* têm uma menor taxa de infecção em hospedeiros com mixomatose do que em animais saudáveis.

Neste estudo, houve uma associação entre a intensidade parasitária de *Eimeria media* e *Eimeria piriformis* e o local de captura. Para ambos, foi encontrada uma maior prevalência nos meses de Novembro a Dezembro. Em relação à *E. media* foi também detectada uma relação com o IGR, sendo a sua prevalência superior em animais magros, o que contraria a ideia que esta espécie é apatogénica (não causaria danos nas vilosidades intestinais). As coccidioses num ambiente selvagem apresentam, geralmente, um menor impacto em termos de mortalidade do hospedeiro, quer em relação ao cativeiro quer em relação às doenças de etiologia vírica (RIPAC 2004).

Pela análise estatística, verificou-se também que apenas sete animais apresentam todos os parasitas encontrados e, para além de terem valores de IGR de 0 e 1, são todos dos locais de Rosais e Urzelina. Este dado pode sugerir que estas regiões podem ter uma menor disponibilidade alimentar.

A técnica de flutuação utilizada não é a recomendada para a recuperação de ovos do tremátode *F. hepatica* pois a elevada densidade da solução provoca a deformação e ruptura dos ovos, por fenómenos osmóticos. Para pesquisa deste parasita é recomendável usar os métodos de sedimentação com adição de um corante de contraste, permitindo destacar a cor amarelo dourado dos ovos.

Quanto aos resultados obtidos para pesquisa de *Neospora caninum*, pela observação das figuras 10 e 11, podemos verificar que em ambas as amplificações, o protocolo utilizado foi eficaz, pois é visível uma banda correspondente às 337 pares de base, no controlo positivo. Quanto às amostras analisadas apresentam resultado negativo. Não obstante, estes resultados podem ser devidos a vários factores: a ausência do protozoário ou insuficiente quantidade do seu DNA para uma correcta visualização após a amplificação; excesso de DNA não relacionado com o DNA molde que pode interferir com a acção dos primers.

5. Conclusão:

É inquestionável a importância ecológica, venatória e cinegética do coelho-bravo. Ele constitui uma das espécies-presa mais marcante dos ecossistemas mediterrâneos ibéricos com influência na vertente da exploração cinegética, com significativas receitas económicas, mas também como espécie-chave pelo desempenho que desenvolve na dinâmica dos ecossistemas em que está inserido.

O coelho-bravo actua como reservatório e hospedeiro intermediário de formas larvares infectantes para carnívoros selvagens e/ou domésticos.

A variedade de helmintes encontrados é muito pobre comparativamente àquela existente na Península Ibérica, onde a riqueza em parasitas gastrointestinais é a maior, relativamente ao resto da Europa.

Este estudo parece apoiar a ideia de Marchandeu *et al.* 1999, de que para além das lesões directas das coccídeas, as coccidioses podem-se tornar mais significativas quando o animal está sujeito a outros organismos patogénicos como os vírus responsáveis pela mixomatose e pela doença hemorrágica vírica e/ou lesões como a enterocolite epizootica do coelho (Coudert *et al.* 2000).

Observa-se um resultado estatístico significativo em relação à quantidade de gordura renal e a presença de parasitas adultos de *G. strigosum* bem como de *E. media*. Para os diferentes locais de captura, existe uma diferença estatisticamente significativa na prevalência de ovos e adultos de *G. strigosum*.

Verificou-se que o sexo tem influência na prevalência de *G. strigosum* e de céstodes adultos e que as datas de captura têm influência na prevalência de *E. media* e *E. piriformis*.

As conclusões alcançadas são meramente indicativas da situação actual relativa ao estado sanitário dos coelhos selvagens da ilha de S. Jorge em termos de parasitoses gastrointestinais, podendo não ser generalizáveis ao resto da população.

Futuramente, será interessante determinar o efeito de infestações parasitárias concomitantes na condição corporal do coelho-bravo.

Fica ainda por relacionar o estudo das parasitoses gastrointestinais com outras patologias, como a mixomatose e a doença hemorrágica viral.

Para uma melhor interpretação dos resultados, será necessária uma correcta avaliação da distribuição populacional do coelho-bravo nesta ilha, bem como das condições climáticas das várias regiões.

Até ao momento, não foi possível o verdadeiro impacto da neosporose bovina na ilha de S. Jorge, dado esse importante na compreensão dos resultados negativos até agora obtidos no estudo da *Neospora caninum*.

6. Referências bibliográficas:

Azevedo EB (2001) “Condicionantes Dinâmicas do Clima do Arquipélago dos Açores. Elementos para o seu estudo” **Açoreana** 9, 309-317.

Baszler TV, Gay LJC, MTL, Long, MT, Mathison BA (1999) “Detection by PCR of *Neospora caninum* in Fetal Tissues from Spontaneous Bovine Abortions” **J. Clin. Microbiol.**, 37(12), 40-59.

Beverley JK, Caley JP, Roseman CJ (1954) “Human *Toxoplasma* infection” **J. Hyg.** 52, 37-46

Bhat TK, Jithendran KP, Kurade NP (1996) “Rabbit coccidiosis and its control: a review” **World Rabbit Science** 4, 37–41.

Blasco, S, Torres J, Feliu C, Casanova JC, Miquel J, Moreno S (1996) “The helminth fauna of *Oryctolagus cuniculus* in the Iberian Peninsula: Faunistic and ecological considerations” **Parasite** 4, 327–333.

Boag B (1988) “Observations on the seasonal incidence of mixomatosis and its interactions with helminth parasites in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)” **Journal of Wildlife Diseases** 24(3), 450-455

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) “Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited” **Journal of Parasitology** 83, 575-583

Canada N, Meireles S, Rocha A, Sousa S, Thompson G, Dubey JP, Correia da Costa JM (2002a) “First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetuses from a dairy herd with endemic neosporosis” **Veterinary Parasitology** 110, 11-15

Canada N, Rocha A, Meireles CS, Correia da Costa JM (2002b) “Neosporose em Portugal e novos métodos de diagnóstico e isolamento do parasita” **Congresso de Ciências Veterinárias, proceedings**, 139-148

Carlos BC (1997) “Producciones Cinegéticas, Apícolas y Otras” **Zootecnia – Bases de Produccion Animal** 12, 125-144

Carvalho GDF, Almeida, LMM (1990) “Contribuição para o estudo de uma população de coelhos selvagens *Oryctolagus cuniculus* L. da ilha das Flores, arquipélago dos Açores – Portugal. Flores/89” **Relatórios e Comunicações do Departamento de Biologia** 18, 73-81.

Carvalho G, Ferrand N, Fonseca A, Branco M, Azevedo M, Mendes R, Batista P, Mântua P (1992) “Estudo de uma população de coelhos selvagens (*Oryctolagus cuniculus*, L.) na ilha de S. Jorge- Açores” **São Jorge e Topo/92: Relatório**, 8-20

Cedillo CJR, Martínez MJJ, Santacruz AM, Banda RVM, Morales SE (2008) “Models for experimental infection of dogs fed with tissues from fetuses and neonatal cattle naturally infected with *Neospora caninum*” **Vet. Parasitol.** 154, 151-155

Coudert P, Licois D, Drouet-Viard F (1995) “Eimeria and Isospora. Eimeria species and strains of rabbits” in Eckert J, Braun R, Shirley MW, Coudert P (Eds). **Biotechnology. Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research**. Office for official publications of the European communities, 52-73.

Coudert P, Jobert JL, Larour G, Guittet M (2000) “Relation entre l’entéropathie épizzotique du lapin (EEL) et l’infestation par les coccidies :enquête épidémiologique » **10èmes Journées de la Recherche Cunicule**, 239-242.

Dubey JP, Schares G (2006) “Diagnosis of bovine neosporosis” **Veterinary Parasitology** 140, 1-34

Dudzinski M L, Mykytowycz R (1963) “Relationship between Sex and Age of Rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.) and Infection with Nematodes *Trichostrongylus retortaeformis* and *Graphidium strigosum*” **The Journal of Parasitology** 49 (1), 55-59

Dunsmore JD, Dudzinski M L (1968) “Relationship of Numbers of Nematode Parasites in Wild Rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.), to Host Sex, Age, and Season” **The Journal of Parasitology** 54 (3), 462-474

Folstad I, Karter AJ (1992) “Parasites, bright males and the immunocompetence handicap” **Am. Nat.** 139, 603-622

Fonseca A (2006) “Análise da origem e dispersão das populações de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) dos arquipélagos dos Açores, Madeira e Canárias através da utilização de marcadores genéticos nucleares e de DNA-mitocondrial” **PhD Thesis**, Universidade dos Açores

Foronda P, Valladares B, Lorenzo-Morales J, Ribas A, Feliu C, Casanona JC (2003) “Helminths of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Macaronesia” **Journal of Parasitology** 89 (5), 952-95

Foreyt WJ (2001) “Diagnostic Parasitology” in **Veterinary Parasitology** 5^oEd. Iowa State Press, 3-10

Frutuoso G (2005) “Saudades da Terra” **Instituto Cultural de Ponta Delgada**

Gonçalves D, Rodrigues T, Ferreira C, Paupério J, Alves PC (2007) “Gestão de espécies cinegéticas no Arquipélago dos Açores” **1^o Relatório Anual. CIBIO-UP.Porto**

Gondim LF (2006) “*Neospora caninum* in wildlife” **Trends Parasitol.** 22, 247-252

Hartley WJ (1961) “Experimental transmission of toxoplasmosis in sheep” **N. Z. Vet. J.** 9, 1.

Hobbs RP, Twigg LE, Elliot AD, Wheeler AG (1999) “Evaluation of the association of the parasitism with mortality of wild European rabbits *Oryctolagus cuniculus* (L) in south Western Australia” **Journal of Parasitology** 85, 803-808.

Hughes JM, Williams RH, Morley EK, Cook DAN, Terry RS, Murphy RG, Smith JE, Hide G. (2006) “The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations” **Parasitology** 132, 29-36

Jelínková A, Licois D, Pakandl M (2008) “The endogenous development of the rabbit coccidium *Eimeria exigua* Yakimoff, 1934” **Vet Parasitol** 156, 168-172

Lally NC, Jenkins MC, Dubey JP (1996) “Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene” **Mol. Biochem. Parasitol.** 75, 169-178

Lello J, Boag B, Fento A, Hudson PJ (2005) “The effect of single and concomitant pathogen infection on condition and fecundity of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)” **International Journal of Parasitology** 32, 1509-1515

Marchandeau S, Aubineau J, Baudron P, Blanchet L, Chauvet C, Legros E, Merlet C, Suret H. (1999) “La pathologie de lapin du garenne dans l’Ouest de la France”. **Bull. Mens. de l’Office National de la Chasse** 245, 10-16

Mathias ML, Ramalhinho MG, Santos-Reis M, Petrucci-Fonseca F, Libois R, Fons R, Ferraz de Carvalho G, Oom MM, Collares-Pereira M. (1998) “Mammals from the Azores islands (Portugal) : and updated review” **Mammalia** t.62, n°3, 397-407

Molina X, Casanova JC, Feliu C (1999) “Influence of host weight, sex and reproductive status on helminth parasites of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, in Navarra, Spain” **Journal of Helminthology** 73, 221-225

Molina X, Casanova JC, Feliu C, Castián E (1998) “Studies of wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) populations in Navarra (Spain). III. Qualitative and quantitative composition of the rabbit parasitic helminthfauna” **Gib. Faun. Sauv. Game Wildlife** Vol.15 (2), 123-133.

Müller N, Zimmermann V, Hendrich B, Gottstein B. (1996) “Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay” **Journal of Clinical Microbiology** 34, 2850-2852

Pakandl M, Ahmed NE, Licois D, Coudert P (1996) “*Eimeria magna* Pérard, 1925: study of the endogenous development of parental and precocious strains” **Veterinary Parasitology** 65, 213-222

RIPAC: “Rede de recolha e Identificação de Patologias em Animais Cinegéticos – Relatório Final” (2004) **Federação de Caçadores Portugueses do Algarve e Direcção Regional de Agricultura do Algarve**, 27-30

Schoeb TR, Cartner SC, Baker RA, Gerrity LW (2007) “Parasites of Rabbits” in Baker DG (Ed) **Flynn’s Parasites of Laboratory Animals** 2º Ed, Blackwell Publishing 251-499.

Silva L, Land EO, Luengo JL R (2008) “Avaliação das EEI na Macaronésia” in Silva L, E Ojeda Land & JL Rodríguez Luengo (eds.) **Flora e Fauna Terrestre Invasora na Macaronésia. TOP 100 nos Açores, Madeira e Canárias**, Arena, Ponta Delgada, 29-50.

Sneddon IA (1991) “Latrine use by the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)” **Journal of Mammology** 72, 769-775

Soulsby EJJ (1987) “Cestodes” in **Parasitologia e enfermedades parasitarias en los animales domésticos**, Interamericana 7ªEd, 63-64

Sroka J, Zwoliński J, Dutkiewicz J, Toś-Luty S, Latuszyńska J(2003) “Toxoplasmosis in rabbits confirmed by strain isolation: A potencial risk infection among agricultural workers” **Ann Agric Environ Med**, 10, 125–128.

Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ (1989) “Roedores” in **Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico**, 147-163

Thompson G, Canada N, Topa M, Silva E, Rocha A(2001) “First confirmed case of *Neospora caninum* associated abortion outbreak in Portugal” **Reproduction of domestic animals** 36, 1-4.

Williams RH, Morley EK, Hughes JM, Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G(2004) “High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts” **Parasitology** 130, 301-307

Whitlock SC (1939) “Infection of Cottontail Rabbits by *Cysticercus Pisiformis* (*Taenia pisiformis*)” **The Journal of Wildlife Management** 3 (3), 258-260

Yamaga M, Flechner O, Gottstein B (1996) “*Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally-infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR)” **Journal of Parasitology** 82, 272-279

7. Anexos

Amostra	Data da captura	Freguesia	Sexo	Idade	Gl. Mamárias	Embriões	IGR
A1	Set. 2011	Topo	F	A	GD	0	2
A2	Set. 2011	Topo	M	A			1
A3	Set. 2011	Topo	M	J			0
A4	Set. 2011	Topo	F	A	GD	0	1
A5	Set. 2011	Topo	F	A	ND	0	0
A6	Set. 2011	Topo	M	A			0
B1	Set. 2011	Nortes	M	A			1
B2	Set. 2011	Nortes	F	A	ND	0	0
B3	Set. 2011	Nortes	F	A	ND	0	0
B4	Set. 2011	Nortes	F	A	ND	0	0
B6	Set. 2011	Nortes	M	A			0
B7	Set. 2011	Nortes	M	A			0
B8	Set. 2011	Nortes	M	A			0
C1	Set. 2011	Urzelina	M	A			1
C2	Set. 2011	Urzelina	M	A			1
C3	Set. 2011	Urzelina	M	A			1
C4	Set. 2011	Urzelina	M	A			1
C5	Set. 2011	Urzelina	F	A	GD	0	3
C6	Set. 2011	Urzelina	F	A	ND	0	2
C7	Set. 2011	Urzelina	F	A	GD	0	0
C8	Set. 2011	Urzelina	M	A			1
D1	Set. 2011	Rosais	F	J	ND	0	0
D2	Set. 2011	Rosais	F	A	ND	0	0
D3	Set. 2011	Rosais	F	A	ND	0	0
D4	Set. 2011	Rosais	M	A			0
D5	Set. 2011	Rosais	M	A			0
D5-B	Set. 2011	Rosais	M	A			0
D6	Set. 2011	Rosais	M	A			0
D7	Set. 2011	Rosais	M	A			1
D8	Set. 2011	Rosais	F	A	ND	0	0
A1	Out. 2011	Topo	F	A	ND	0	1
A2	Out. 2011	Topo	M	A			1
A3	Out. 2011	Topo	F	A	ND	0	1
A4	Out. 2011	Topo	F	A	GD	0	2
A5	Out. 2011	Topo	F	A	ND	0	1
A6	Out. 2011	Topo	F	A	ND	0	1
B1	Out. 2011	Nortes	M	A			2
B3	Out. 2011	Nortes	M	A			2
B5	Out. 2011	Nortes	M	A			1
B7	Out. 2011	Nortes	M	A			1
C1	Out. 2011	Urzelina	M	A			0
C2	Out. 2011	Urzelina	F	A	ND	0	0
C3	Out. 2011	Urzelina	F	A	ND	0	0

Amostra	Data da captura	Freguesia	Sexo	Idade	Gl. Mamárias	Embriões	IGR
C4	Out. 2011	Urzelina	M	A			0
C5	Out. 2011	Urzelina	M	A			2
C6	Out. 2011	Urzelina	M	A			0
C7	Out. 2011	Urzelina	F	A	ND	0	1
C8	Out. 2011	Urzelina	M	A			0
D1	Out. 2011	Rosais	M	A			0
D2	Out. 2011	Rosais	F	A	ND	0	0
D4	Out. 2011	Rosais	F	A	ND	0	1
D5	Out. 2011	Rosais	F	A	ND	0	0
D6	Out. 2011	Rosais	F	A	ND	0	0
D7	Out. 2011	Rosais	F	A	GD	0	0
D8	Out. 2011	Rosais	M	A			1
D9	Out. 2011	Rosais	M	A			0
A1	Nov.2011	Topo	F	J	ND	0	0
A2	Nov. 2011	Topo	M	J			0
A3	Nov. 2011	Topo	F	A	GD	0	1
A4	Nov. 2011	Topo	M	A			2
A5	Nov. 2011	Topo	F	A	ND	0	1
A6	Nov. 2011	Topo	F	A	ND	0	2
C1	Nov. 2011	Urzelina	M	A			2
C3	Nov. 2011	Urzelina	M	A			1
C4	Nov. 2011	Urzelina	M	A			1
C5	Nov. 2011	Urzelina	M	A			1
C7	Nov. 2011	Urzelina	F	J	ND	0	1
C8	Nov. 2011	Urzelina	F	J	ND	0	1
D1	Nov. 2011	Rosais	F	A	ND	0	2
D2	Nov. 2011	Rosais	M	A			1
D3	Nov. 2011	Rosais	M	A			3
D4	Nov. 2011	Rosais	F	A	GD	0	1
D5	Nov. 2011	Rosais	M	A			1
D6	Nov. 2011	Rosais	F	A	ND	0	2
D8	Nov. 2011	Rosais	F	A	ND	0	0
B1	Dez. 2011	Nortes	F	A	ND	0	1
B2	Dez. 2011	Nortes	M	A			1
B3	Dez. 2011	Nortes	M	A			1
B4	Dez. 2011	Nortes	M	A			1
B5	Dez. 2011	Nortes	M	A			2
B6	Dez. 2011	Nortes	F	A	ND	0	2
B7	Dez. 2011	Nortes	M	A			2
B8	Dez. 2011	Nortes	M	A			1
C1	Dez. 2011	Urzelina	M	A			1
C2	Dez. 2011	Urzelina	F	A	ND	0	3
C4	Dez. 2011	Urzelina	F	A	ND	0	3
C5	Dez. 2011	Urzelina	M	A			2

Amostra	Data da captura	Freguesia	Sexo	Idade	Gl. Mamárias	Embriões	IGR
C6	Dez. 2011	Urzelina	M	A			2
C7	Dez. 2011	Urzelina	M	A			3
D2	Dez. 2011	Rosais	M	A			1
D3	Dez. 2011	Rosais	F	A	ND	0	0
D6	Dez. 2011	Rosais	M	A			1
D8	Dez. 2011	Rosais	F	A	ND	0	2
C1	Jan. 2012	Urzelina	M	A			1
C2	Jan. 2012	Urzelina	M	A			2
C2-B	Jan. 2012	Urzelina	M	A			2
C3	Jan. 2012	Urzelina	F	A	GL	0	1
C4	Jan. 2012	Urzelina	M	A			1
D8	Jan. 2012	Rosais	M	A			2

Tabela 1: Características dos coelhos usados no estudo M – Macho; F – Fêmea; J – Juvenil; A – Adulto; ND – Gl. Não desenvolvida; GL – Gl. desenvolvida ; GL – Lactante; IGR – Índice de gordura renal.

Espécie	Oocisto(µm)		Cor	Forma	Caraterísticas para disitinação das espécies
	Comprimento	Largura			
E. exigua	16.0 (12-19)	13.0 (11-15)	Roxo	Sub-esféstica	Tamanho; forma
E. perforans	22.3 (17-38)	14.1 (11.5-17)	Roxo a azul	Elipsóide	Tamanho; cor
E. intestinalis	29.1 (26-34)	18.2 (16-20)	Amarelo esverdeado	Piriforme	Forma
E.piriformis	31.6 (24-36)	19.7 (18-21)	Amarelo escuro	Piriforme	Forma
E. media	29.1 (23-34)	17.2 (14-20)	Amarelo	Elipsóide	Tamanho
E. flavescens	32.1 (27-37)	21.4 (20-23)	Amarelo escuro	Ovóide	Forma
E. magna	35.2 (30-42)	21.8 (18-26)	Vermelho acastanhado	Ovóide	Presença de colar em torno do micrópilo
E. steidai	36.2 (34-40)	20.6 (18-22)	Amarelo escuro	Elipsóide	Tamanho
E. irresidua	39.1 (35-45)	24.3 (21-27)	Castanho esverdeado	Elipsóide	Tamanho
E. coecicola	34.5 (29.5-42)	18.5 (16-20)	Amarelo claro	Elipsóide	Tamanho; forma

Tabela 2: Características dos oocistos de espécies de *Eimeria spp.* do coelho-bravo (Hobbs et al. 1998)