

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**MONITORIZAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS ÁGUAS
EM
EXPLORAÇÕES CUNÍCULAS E ESTUDO SOBRE A MANIPULAÇÃO
DA FLORA ENTÉRICA EM COELHOS**

Dinis Pereira Amorim do Rego

Orientador – Prof. Dr. Paulo Martins da Costa

Co-Orientador – Dr. Romeu Simões

Co-Orientador – Dr. André Pinto de Carvalho

Porto 2012

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**MONITORIZAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS ÁGUAS
EM
EXPLORAÇÕES CUNÍCULAS E ESTUDO SOBRE A MANIPULAÇÃO
DA FLORA ENTÉRICA EM COELHOS**

Dinis Pereira Amorim do Rego

Orientador – Prof. Dr. Paulo Martins da Costa

Co-Orientador – Dr. Romeu Simões

Co-Orientador – Dr. André Pinto de Carvalho

Porto 2012

Sumário

A componente experimental do estágio de final de curso, que deu origem a esta dissertação de mestrado foi realizada no biotério de coelhos e no laboratório de inspeção, microbiologia e tecnologia alimentar do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto. Numa primeira fase, o objetivo centrou-se na avaliação do efeito de um “auto-probiótico” na flora intestinal de coelhos durante a fase de crescimento. Motivou este estudo a enorme pressão que paira atualmente sobre o uso de antibióticos em espécies pecuárias. O estudo foi realizado recorrendo a 12 animais divididos por 2 grupos com o objetivo de avaliar o efeito da substituição dos antimicrobianos vinculados no alimento composto por um “auto-probiótico” com estirpes microbianas isoladas de fezes de coelhos saudáveis, oriundos da exploração que forneceu os coelhos para o estudo. Durante os quatro meses de estágio foi também possível acompanhar várias explorações cunículas, das quais foram analisados amostras de cecos recolhidos em animais com suspeita de Enteropatia Epizootica, e amostras de água de consumo dos coelhos para uma análise microbiológica. O estudo relativo ao efeito do “auto-probiótico” nos coelhos como substituto aos antimicrobianos, revelou resultados ambivalentes em virtude dos animais testados terem revelado, numa primeira fase, alterações digestivas e um crescimento inferior ao grupo com antimicrobianos, embora na fase final dos ensaios se tivesse observado um crescimento compensatório. A desinfecção das águas de consumo dos coelhos revelou-se um importante fator na redução da contaminação fecal e total das mesmas, estando associado às explorações que efetuaram o tratamento das águas melhores índices zootécnicos e sanitários. Este trabalho representa uma primeira aproximação ao estudo do controlo da flora intestinal na produção cunícula e na avaliação da relação entre qualidade microbiológica da água e produtividade.

Agradecimentos

Refiro os contributos indispensáveis para execução de tamanho trabalho:

Ao Prof. Dr. Paulo Martins da Costa, meu orientador, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, por toda a dedicação, compreensão e amizade patenteadas, pelos desafios, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo deste ano de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao Dr. André Pinto de Carvalho pela disponibilidade, aconselhamentos e ensinamentos ao longo desta tese, bem como generosidade, amizade, companhia e por me dar a oportunidade de conhecer de perto a produção cunícula, e pelos almoços.

Ao Dr. Romeu pela amizade e por toda a ajuda e companhia durante estes últimos anos de faculdade.

Ao Sr. António Santana, Diretor regional da Alimentação Animal Nanta S.A., por toda a disponibilidade e apoio demonstrado para a conclusão desta tese.

A todos os Professores do Mestrado Integrado Medicina Veterinária, pelos ensinamentos, apoio, disponibilidade e muitas vezes amizade, ao longo dos muitos anos de curso.

Ao Dr. Nuno, da Clínica veterinária de Barcelos pela ajuda, amizade e incentivos demonstrados ao longo dos anos, e às assistentes Mafalda e Natália.

A todos os novos amigos que encontrei no laboratório de tecnologia alimentar do ICBAS, bem como aqueles dos Laboratórios de departamento de produção aquática e microbiologia.

A todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado e que fui encontrando ao longo deste curso, durante Erasmus e durante esta tese, de realçar os “supertranquilos” e em especial ao: André Aires, César Gomes, Carla, Cristina, Daniel, Elisabete, Joantina, João Morais, Júlio, Magda, Marisa, Moisés, Nuno Beça, Pedro Garcia, Rodrigo, Sérgio Gomes, Susaninha – Obrigada pessoal.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais e irmãos, pelo apoio e compreensão inestimáveis, pelos diversos sacrifícios suportados e pelo constante encorajamento para concluir o curso.

A todos, enfim, reitero o meu apreço e a minha eterna gratidão

Índice

<i>Parte I: Cunicultura e patologias dos coelhos</i>	1
1. O Coelho e a Cunicultura	1
1.1. Taxonomia	1
1.2. Características produtivas do coelho	1
1.2.1. Patologias emergentes em produção cunícula.....	3
1.3. Produção cunícula em Portugal	6
2. Enteropatia Epizoótica.....	8
2.1. História.....	8
2.2. Etiologia	8
2.3. Diagnostico	10
2.4. Tratamento e Prevenção.....	10
2.5. Impacto das Enteropatias nos coelhos de produção.....	11
<i>Parte II: Avaliação do impacto da utilização de um “auto-probiótico” na flora entérica e na produtividade durante a fase de crescimento</i>	12
3. Probióticos e a produção animal	12
3.1. Probióticos e outros aditivos alimentares.....	13
3.2. Alternativas para a produção Cunícula.....	14
4. Material e Métodos (I).....	16
4.1. Biotério Coelhos	16
4.2. Processamento microbiológico das fezes e cecos de Coelho	17
5. Resultados.....	18
6. Discussão/Conclusão Probióticos e Enteropatia Epizoótica.....	20
<i>Parte III: Monitorização da qualidade microbiológica da água em explorações cunículas</i>	23
7. Água e produção cunícula.....	23
7.1. Controlo microbiológico da água	24
7.1.1. Coliformes	25
7.1.2. Enterococcus	26
7.1.3. Clostridium perfringens	27

7.1.4. Microrganismos Totais a 22°C e 37°C	27
7.2. Desinfecção e Sanitização das águas de consumo dos coelhos	28
7.2.1. Cloro.....	28
7.2.2. Peróxido de Hidrogénio.....	29
8. Material e métodos (II)	30
8.1. Análise microbiológica água.....	30
9. Resultados.....	31
10. Discussão/Conclusão Água de consumo dos Coelhos	32
11. Observação Final.....	34
<i>Bibliografia.....</i>	<i>35</i>
<i>Anexo I</i>	<i>I</i>
<i>Anexo II</i>	<i>II</i>
<i>Anexo III</i>	<i>III</i>
<i>Anexo IV.....</i>	<i>VII</i>
<i>Anexo V.....</i>	<i>VIII</i>
<i>Anexo VI.....</i>	<i>IX</i>
<i>Anexo VII.....</i>	<i>X</i>
<i>Anexo VIII.....</i>	<i>XI</i>

Parte I: Cunicultura e patologias dos coelhos

1. O Coelho e a Cunicultura

1.1. Taxonomia

Os coelhos são mamíferos da ordem *Lagomorfos* e da família *Leporidae*, muitas vezes erradamente incluídos na ordem dos roedores. Enquanto os roedores possuem apenas um par de incisivos na maxila, os coelhos possuem dois pares, um em frente do outro. Têm uma fisiologia digestiva particular, caracterizada por uma dupla excreção fecal com a capacidade de produzir e reingerir parte do material fecal, as denominadas fezes moles ou cecotrofos, o que lhes permite um melhor aproveitamento de nutrientes, proteínas e vitaminas do complexo B, dos alimentos vegetais. Na família *Leporidae* existem vários géneros, dos quais podemos nomear o *Lepus* (várias espécies de lebres), *Caprolagus* (coelho asiático), *Sylvilagus* (várias espécies de coelho americano), *Psittacus* (coelho africano) e o *Oryctolagus* (coelho europeu) (Mourão, 2003). Existem mais de 100 espécies descendentes do coelho selvagem europeu, sendo o Branco Neozelandês e o Californiano as espécies mais comuns usadas na produção cunícula na Europa.

1.2. Características produtivas do coelho

O coelho proporciona ao homem diversos produtos. Embora a maioria da produção seja vocacionada para produção de carne, estes podem também ser criados com a finalidade de produzir pele e pêlo. Os coelhos são animais muito tímidos e sensíveis: ruídos, cheiros, mudanças ambientais, erros de manejo, más condições de higiene e degradação da qualidade do ar têm um impacto negativo na produtividade, nomeadamente na mortalidade e no crescimento dos animais. Várias características produtivas do coelho estão expressas no Quadro 1.

Quadro 1: Características produtivas do coelho.

Parâmetro Produtivo	Valor
Nº de láparos nascidos/parto	8-11 (1-20)
Peso ao nascimento	50 a 64 gramas
Idade ao desmame	30 a 35 dias
Peso ao desmame	700 a 940 gramas
Ganho médio de peso/dia engorda	38 a 40 gramas
Índice conversão engorda	2,5 a 3,0
Idade venda	61 a 73 dias
Peso venda	1,9 a 2,5 Kg
Gestação	29 a 32 dias
Intervalo entre partos	42 dias
Fertilidade	80 a 90%
Mortalidade ninhós	8 a 20%
Mortalidade engorda	2 a 7%
Vida produtiva	1 a 3 anos

Fonte: Adaptado de Mourão & Pinheiro (2004) e Rebollar (2007).

O número de partos, a intensidade reprodutiva e a exposição a temperaturas elevadas são fatores que influenciam diretamente a prolificidade (Mourão e Pinheiro, 2004). A sazonalidade reprodutiva é também influenciada pela temperatura e pelas condições sanitárias da exploração.

A temperatura é um dos fatores mais importantes na produção cunícula, situando-se nos 21°C a temperatura de conforto térmico dos coelhos. Quando os animais são expostos a elevadas variações de temperatura na exploração, com muito frio durante a noite e muito quente durante o dia, a produção de calor ou dissipação de calor, respetivamente, tem que ser realizada pelo coelho para manter uma temperatura corporal constante, implicando um gasto energético suplementar (Finzi *et al.*, 1992). Este gasto terá um grande impacto na fertilidade e taxa de crescimento dos coelhos, e na produtividade da exploração (Eschborn, 1985). O aparelho respiratório, a mucosa nasal e o pavilhão auricular dos coelhos, são os principais mecanismos de termorregulação.

No verão com o aumento da temperatura, há um decréscimo drástico do consumo de alimento composto. Aumenta a frequência respiratória e a evaporação corporal, assumindo os coelhos uma posição ortopneica para conseguirem arrefecer. A ingestão de uma maior quantidade de água também contribui para o arrefecimento. Por contraste, num ambiente com uma temperatura abaixo de 10°C, os animais enrolam-se sobre si próprios para minimizar a perda de calor, baixando também a temperatura dos pavilhões auriculares. As baixas temperaturas intensificam o consumo de alimento composto para manter a temperatura corporal, resultando numa diminuição da conversão do alimento em energia de reserva e maiores gastos de alimento composto para o produtor. A temperatura da água também influencia o consumo de alimento composto, havendo na presença de água fria um aumento do seu consumo. Flutuações de temperatura na produção cunícula podem levar ao aparecimento de vários tipos de patologias, entre elas as enterites. Baixas temperaturas levam ao aumento do consumo de alimento composto, a um aumento de carboidratos no trato digestivo, e consequente proliferação de patógenos no intestino e toxinas por estes libertados. Os coelhos toleram melhor baixas temperaturas do que altas temperaturas (Lebas & Matheron, 1982), tendo dificuldade em regular a sua temperatura interna a partir dos 35°C; a partir dos 40°C surgem desmaios, salivação e um grau de exaustão conduzindo à morte (Lebas *et al.*, 1986).

Os coelhos são também muito sensíveis à qualidade do ar. Um ambiente com uma humidade relativa elevada (> 80%) (Silva, 2002), com uma grande concentração de amoníaco e com uma elevada circulação de ar na exploração favorecem o aparecimento de patologias do foro respiratório. Todavia, uma ventilação mínima de 0,1 a 0,2 m/s no Inverno e 0,2 a 0,4 m/s no Verão (Silva, 2002), é necessária nos pavilhões de cunicultura para eliminar todos os gases tóxicos, principalmente o amoníaco, expelir o excesso de humidade, e dissipar o calor num pavilhão com grande densidade animal na época quente.

As coelhas são poliéstricas, com ovulação induzida pela cópula, utilizando-se atualmente a inseminação artificial após estimulação prévia mediante a administração de uma gonadotrofina. Os coelhos são animais sazonais, variando a sua atividade reprodutiva com o fotoperíodo.

A alimentação animal é outro dos fatores responsáveis por uma boa produção cunícula, utilizando diferentes alimentos compostos nas várias fases de produção cunícula. A produção de alimento composto para a cunicultura atingiu as 93 mil toneladas em 2011, com um decréscimo de 2,1 % relativamente ao período homólogo de 2010. A produção de alimento composto para a cunicultura representa 3 % da produção total de alimentos compostos em Portugal (IACA, 2012).

O stress nos coelhos tem uma marcada influência no balanço entre bactérias benéficas e bactérias patogénicas no trato digestivo, e consequentemente na performance produtiva. Torna-os extremamente suscetíveis a distúrbios digestivos, principalmente durante o período de desmame (Peeters *et al.*, 1995). Este facto obriga à incorporação de antibióticos nos alimentos compostos para coelhos.

1.2.1. Patologias emergentes em produção cunícula

Atualmente a patologia cunícula está a evoluir a um ritmo elevado, proporcionalmente à profissionalização e industrialização do sector de produção cunícula. Simultaneamente às mudanças de manejo, de instalações e das técnicas de reprodução há o aparecimento de novas patologias multi-factoriais nas explorações (Szili & Köhalmi, 1980; Torres *et al.*, 1992; Percy & Barthold, 2001; Van Rooij *et al.*, 2006).

A Pasteurelose é uma das patologias mais frequentes na cunicultura, contribuindo bastante para a mortalidade de coelhos devido principalmente aos problemas respiratórios que provoca (Rosell *et al.*, 1992). O agente etiológico é a *Pasteurella multocida*, um habitante comensal do trato respiratório dos coelhos (*Fotografia 1, Anexo V*). A elevada densidade populacional de láparos nas jaulas e as más condições de ventilação promovem o aparecimento desta patologia que tem uma maior incidência em animais imunodeprimidos, ou sob stress físico (parto, lactação, mau manejo) e/ou stress térmico (Camps, 1995). Tosse e espirros são os primeiros sinais que se observam, seguindo-se as descargas ocular e nasal de natureza mucosa (Frymus *et al.*, 1991) (*Fotografia 2, Anexo V*). A maioria dos animais que recuperam tornam-se portadores assintomáticos (Frymus *et al.*, 1991).

A Coccidiose intestinal é uma patologia do foro intestinal provocada por protozoários do género *Eimeria* spp.. No caso da *E. stidae* o fígado também pode ser afetado. Os parasitas desta patologia exercem uma ação destruidora sobre epitélios e endotélios do trato digestivo. Os oocistos da *Eimeria* spp. têm a capacidade de resistir no solo e na água de bebida. Quanto menor a higiene do local e maior o número de coelhos na mesma jaula, maior o perigo de

contágio. Os sintomas incluem perda de apetite, aumento do volume abdominal, diarreia e uma diminuição do ganho médio diário (GMD). O conteúdo intestinal apresenta um aspeto fluido, espumoso, com estrias de sangue e, num estado mais avançado, um aspeto caseoso.

O Síndrome digestivo dos coelhos é o síndrome que mais perdas económicas provoca na exploração intensiva animal (elevada morbilidade e mortalidade). Está intimamente relacionado com desvios nas condições de higiene, de manejo e de alimentação. Entre os agentes etiológicos responsáveis destacam-se os serotipos de *E. coli* e protozoários da *Eimeria* spp.. As principais manifestações deste síndrome vão desde uma diarreia (Enterite catarral, Disenteria, Tifo-colite hiperaguda) a uma constipação (Parésia cecal, Enteropatia Epizootica, Enterotoxémia), sendo a Colibacilose o processo mais comum. Afeta principalmente láparos com 5 a 7 semanas de vida, com uma sintomatologia típica de afeção do trato digestivo.

A Necrobacilose plantar, ou “ Mal de Patas”, é provocada por *Fusobacterium necrophorum*, *S. aureus*, *Corynebacterium* e outros géneros Gram-positivo. Leva a uma dificuldade de apoio dos membros na jaula, à rejeição dos láparos por parte das mães e consequente emagrecimento e diminuição da taxa de crescimento. As jaulas de malha inadequada, um elevado peso dos animais e ambientes húmidos com excesso de amoníaco predis põem os animais na exploração a um desconforto geral e consequentemente a uma baixa taxa produtiva. Os coelhos apresentam zonas ulceradas, hemorrágicas e crostas na zona plantar e palmar do pé. A prevenção desta patologia é muito simples, passando unicamente pela colocação de um tapete de plástico no fundo da jaula (*Fotografia 3, Anexo V*) (Ruiz *et al.*, 2001).

A Conjuntivite (*Weepy Eye*) dos coelhos é caracterizada por apresentar pálpebras inflamadas, com um lacrimejamento contínuo. Os coelhos tendem a ficar com os olhos fechados, e quando os abrem apresentam uma descarga purulenta, que leva à presença de uma superfície ocular opaca e a uma área peri-ocular húmida. Afeta principalmente os jovens e está muitas vezes associado a uma infeção bacteriana das pálpebras, coligado às más condições de higiene na exploração, como fumos, pó e gases (principalmente amoníaco).

A Dermatofitose (Tinha) é provocada por fungos do género *Tricophyton* (*T. mentagrophytes*) e *Microsporum* (*M. canis*), atinge principalmente coelhos de crescimento, aparecendo com zonas de alopecia circulares na cara, orelhas, membros e lombo. As fêmeas funcionam como portadoras assintomáticas. O contágio desta zoonose pode dar-se de modo: indireto, através de utensílios da exploração; de modo direto, da fêmea para os láparos. Ambientes húmidos, com elevada densidade populacional, presença de animais estranhos e má higiene dos materiais da exploração, são a principal origem desta patologia na produção animal. A principal consequência na exploração passa por um diminuição GMD, aumento dos índices de conversão e descida da produtividade global (*Fotografia 4, Anexo V*).

Os principais agentes etiológicos da Sarna dos coelhos são o *Psorops cuniculi* (sarna psoróptica), *Sarcoptes scabiei* (sarna sarcóptica) e *Notoedres cuniculi* (sarna notoédrica). As explorações mais predisponentes são as que apresentam instalações húmidas com deficiente renovação de ar e escassa iluminação. Uma elevada densidade animal nas jaulas e a presença de roedores na exploração predispõem ao aparecimento da Sarna dos coelhos. Prurido, alopecias e crostas localizados nas extremidades (pavilhão auricular, cabeça e membros), são os principais sintomas apresentados pelos animais.

O *Staphylococcus aureus* nos coelhos tem a capacidade de infectar pequenas feridas na pele e invadir o tecido subcutâneo, sendo o agente responsável pela Estafilocócica dos coelhos (Rossi *et al.*, 1995). A introdução de novos animais infetados e os desvios na zona de conforto, nomeadamente, uma ventilação desajustada (excesso de amoníaco, com uma humidade relativa do ar elevada) uma utilização de desinfetantes irritantes, deficiências em vitaminas (A e do complexo B) e em oligoelementos (Zinco, Cobre, Manganésio, Cobalto), são alguns dos fatores de risco para infeções com *Staphylococcus aureus* (Okerman *et al.*, 1984). O contágio pode ser: direto, entre o produtor e os coelhos ou entre coelhos; indireto, através de jaulas sujas, do pêlo ou do alimento. A introdução de novos reprodutores na exploração é provavelmente a principal causa de contágio (Rossi *et al.*, 1995). A patologia manifesta-se principalmente de duas formas: uma cutânea com a presença de furúnculos no abdómen, membros, pescoço e dorso de láparos lactantes, com elevada mortalidade; uma forma sistémica com mastites purulentas, otites médias e internas e infeções da conjuntiva ocular e pálpebras, muitas vezes associado a *Pasteurella* (Rossi *et al.*, 1995).

A Doença Vírica Hemorrágica é causada por um Calicivírus, transmitindo-se por via respiratória, digestiva e por feridas. Com um período de incubação de 2-3 dias, apresenta uma forma aguda que afeta principalmente láparos a partir dos 45 dias de idade (fase de crescimento), com mortalidade de 80 % a 100 %. Os animais apresentam-se prostrados, com uma dispneia intensa, com incoordenação motora e convulsões, resultando na morte do animal. É frequente visualizar epistaxis nos coelhos afetados pela doença vírica hemorrágica.

A Mixomatose é a principal patologia vírica de coelhos selvagens e domésticos, transmitida pelo vírus *Leporipoxvirus*, por contato direto ou indireto, através de vetores artrópodes. Encontra-se endémica na população selvagem de coelhos (Fenner, 1994). Os sintomas deste vírus apresentam duas formas: forma clássica nodular cutânea, que leva a um edema da cabeça e a uma blefaroconjuntivite bilateral serosa a mucopurulenta e consequente morte do animal após 5 a 7 dias; forma respiratória, com um período de incubação de 7 a 21 dias, com sintomatologia típica de trato respiratório. Elevadas taxas de aborto, mortalidade perinatal e infertilidade anormalmente elevadas, são sinais que indiciam a presença desta patologia na exploração (Fenner, 1994). Existem no mercado vacinas para a doença vírica hemorrágica e para a mixomatose.

A Enteropatia Epizootica, anteriormente denominada como Enterite Mucoide, faz parte das patologias intestinais que são as principais responsáveis por elevadas taxas de morbilidade e mortalidade na produção intensiva de coelhos. Descrita em maior pormenor no Capítulo 2º, o desconhecimento do seu, ou dos seus, agente(s) etiológico(s) e a sua grande facilidade de transmissão e progressão na exploração, tornaram-na numa patologia de elevado interesse e estudo (*Fotografias 5 e 6, Anexo IV*).

As patologias de foro intestinal, na sua maioria são tratadas com antibióticos vinculados nos alimentos compostos. Além de serem patologias emergentes da produção cunícula são a principal causa de morte dos animais, acarretando elevados custos. Um mau manejo dos láparos ao desmame, deficiências de higiene nas jaulas, frio e humidade excessivos, canibalismo e abandono da ninhada, alterações na composição dos alimentos (proporção fibra/proteína) ou na água de bebida, não só levam à morte dos coelhos na fase de crescimento, como muitos destes fatores tem um papel preponderante nas altas taxas de mortalidade no ninho e nas elevadas taxas de infertilidade das fêmeas (*Fotografia 7 e 8, Anexo V*).

1.3. Produção cunícula em Portugal

À escala mundial, a Europa é o principal produtor de carne de coelho (49,9 %), seguido da Ásia (40,5 %), África (7,7 %) e por fim América (1,9 %). A produção comercial de coelho esta presente em pelo menos 14 estados membros da UE, incluindo República Checa, Eslováquia, Polónia e Hungria. Os maiores produtores são a Itália, França e Espanha. Portugal é responsável por cerca de 3,5 % da produção Europeia e 1,8 % da produção Mundial (Colin & Lebas, 1996).

Segundo Pereira (2000) existiam em Portugal, 650 explorações industriais e cerca de 200 mil fêmeas reprodutoras. Valores bastante superiores são apresentados por Lebas & Colin (2000) cujas estimativas indicam a presença de 700 mil fêmeas, 19 mil distribuídas por cerca de 100800 explorações, sendo a sua maioria (71 %) de reduzidas dimensões (número inferior a 20 fêmeas). Recentemente, a produção anual média de carne de coelho em Portugal foi estimada por Xiccato & Trocino (2007) em 20 mil toneladas, colocando este país na 9º posição à escala mundial. Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), a produção de carne de coelho tem vindo a diminuir ao longo dos últimos anos, atingindo em junho de 2007 as 8.055 t., um decréscimo de 7,7 % relativamente ao período homólogo de 2006 (INE, 2008).

A produção cunícula intensiva em Portugal concentra-se principalmente nas regiões Norte e Centro do país, apesar de se encontrarem explorações espalhadas por todo o país. Inicialmente predominavam nas zonas de Viseu, Leiria e Oliveira do Hospital, mas o desenvolvimento desta atividade conduziu ao aumento da sua importância em outras zonas como Trás-os-Montes e Minho.

Os novos pavilhões cunículas construídos em Portugal são fechados, o que permite controlar as condições ambientais e dotá-los de um microclima favorável ao crescimento saudável dos coelhos, incluindo aquecimento e arrefecimento, sistema de renovação de ar por ventilação assistida por extratores ou por ventilação com injeção de ar, sistemas de iluminação artificial e equipamento mecânico de remoção de dejetos (Mateo, 2004) (*Fotografia 9, Anexo V*). Por outro lado existem explorações mais antigas, as mais prevalentes em Portugal, do tipo “semi ar livre”, que contêm janelas, uma rede metálica ou rede de sombreamento nas paredes laterais, revestindo essa região com plástico durante o Inverno, e sem qualquer tipo de ventilação assistida (*Fotografia 8, Anexo V*).

Existem três tipos de jaulas para explorações cunículas, o modelo “*Flat-deck*” ou plano único, o mais popular em Portugal, o modelo Californiano ou planos escalonados e o sistema de Baterias ou planos sobrepostos. Os ninhos, bebedouros e comedouros são na sua maioria de fácil limpeza e higienização. A água é fornecida por bebedouros de chupeta ou de taça (*Fotografia 10, Anexo V*), sendo os comedouros (normalmente partilhados por varias jaulas) de enchimento semiautomático ou automático a partir de silos situados no exterior da exploração. Nas explorações existem normalmente depósitos de armazenamento de água no exterior (*Fotografias 11 e 12, Anexo VI*), utilizados para tratar a água com cloro. Depósitos de água colocados no interior dos pavilhões são utilizados na preparação da medicação e tratamento dos coelhos, alguns também associados ao tratamento das águas de consumo com peróxido de hidrogénio (*Fotografia 13 Anexo VII e Fotografia 14, Anexo VI*). Na maioria das explorações cunículas em Portugal o abastecimento de água provém de poços privados (*Fotografias 15 e 16, Anexo VI*). O controlo microbiológico das águas de poços para consumo exclusivo dos coelhos raramente é efetuado. Não existe nenhum diploma legal para controlo sanitário das águas destinadas à produção cunícula.

O sistema de produção mais popular é o de manejo reprodutivo em bandas. A banda única torna possível a sincronização reprodutiva de elevado número de fêmeas e grupos de coelhos em fase de crescimento com a mesma idade, com uma implementação generalizada da inseminação artificial. Este sistema baseia-se no princípio “*all in, all out*” (sistema *duo*), que permite uma melhor higienização das jaulas e dos pavilhões, com um controlo sanitário eficaz, e melhoria do estado sanitário dos animais da exploração.

Em Portugal o coelho é abatido com aproximadamente 70 dias de idade, correspondendo a 2,100 kg a 2,500 kg de peso vivo. A cobrição das fêmeas ocorre 11 dias após o parto. A idade ao desmame situa-se entre os 30 e 35 dias de idade. Posteriormente: as fêmeas passam para jaulas limpas, continuando os láparos na mesma jaula - sistema *duo*; ou passando os láparos para as jaulas de crescimento - sistema tradicional, até atingirem o peso de abate.

2. Enteropatia Epizootica

Enteropatia Epizootica do coelho (EE) é uma doença gastrointestinal aguda altamente contagiosa, causando em coelhos jovens uma mortalidade que pode ascender a 30-40 % e 100 % de morbilidade (Licois & Coudert, 2005). Afeta principalmente os coelhos na período de desmame e início da fase de crescimento, sendo nesta fase que se encontram as maiores perdas para os produtores cunículas. A EE é caracterizada por uma distensão abdominal, emissão de pequenas quantidades de excrementos aquosos que se seguem após uma diminuição acentuada na ingestão de alimentos e um elevado consumo de água (Licois *et al.*, 1998), não induzindo qualquer hipertermia nos animais (Jobert *et al.*, 2001). Apesar do aumento da mortalidade, a presença de muco nas jaulas e a impactação cecal serem considerados os sinais anátomo-patológicos mais comuns nesta patologia (Licois *et al.*, 1998), as denominações como "Enterite Mucoide" ou "Enteropatia Mucoide", vulgarmente encontradas na literatura, não são as mais adequadas para denominar esta patologia. A excreção de muco e a impactação cecal são reações fisiopatológicas comuns a outras patologias em coelhos (Licois *et al.*, 2005). A EE é uma patologia do trato gastrointestinal que promove a paresia intestinal e consequente dilatação intestinal e multiplicação de microrganismos oportunistas, entre eles *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Eimeria* spp. (Barral *et al.*, 2000).

2.1. História

Entre o final de 1996 e o início de 1997 apareceu nas explorações cunículas, da região oeste de França e da região da Galiza, um novo e grave síndrome gastrointestinal (Coudert *et al.*, 2000). Esta nova patologia caracterizava-se por distensão abdominal, fezes muito líquidas e diminuição acentuada do consumo de alimento composto, originando taxas de mortalidade entre 30% e 80%. Durante os anos que se seguiram, a patologia disseminou-se pelo resto de França (Duval, 1998) e pelos restantes países europeus, entre eles Portugal (Rossi *et al.*, 1999). Devido à sua rápida progressão tem a denominação de Enteropatia Epizootica dos Coelhos (EE). Atinge principalmente coelhos em crescimento, entre as 6 e 8 semanas de vida, no final da fase de amamentação e início da fase de crescimento, porém animais adultos também podem ser afetados. Em comparação com outras epizootias, a EE não está presente nos animais selvagens (Licois *et al.*, 2000).

2.2. Etiologia

Como o surto de EE nas explorações cunículas francesas nos anos 90 surgiu logo após a entrega de alimento composto por uma fábrica comercial, a alimentação foi inicialmente a primeira suspeita. No entanto esta e outras hipóteses estudadas (e.g. pesticidas) não vieram a ser confirmadas (Lebas *et al.*, 1998). Posteriormente, foi demonstrado que a alimentação seria um vetor passivo (Duperray *et al.*, 2000). Apesar de até agora, não estar definido qual o agente

etiológico da EE (Licois D., 1998), vários argumentos suportam uma hipótese viral, nomeadamente pelo *Rotavirus*, particularmente devido à natureza epizootica, à difusão do agente patogénico, à transmissibilidade da doença e à existência de lesões pulmonares histologicamente comprovadas (Marlier *et al.*, 2005). O uso de culturas isoladas de *Rotavirus* em coelhos não reproduziu experimentalmente a EE. Por outro lado, uma hipótese bacteriana é apontada por outros autores (Licois *et al.*, 2005; Dewrée *et al.*, 2003) que excluindo quaisquer estirpes de *E.coli*, conduziram à suspeita de estirpes de *Clostridium*, principalmente de *Clostridium perfringens*, poderiam ser os responsáveis. No entanto, o papel desta bactéria como um patogénico principal ainda é questionável, uma vez que as estirpes bacterianas de *Clostridium* spp., tal como acontece com o *Rotavirus*, não têm sido capazes de reproduzir experimentalmente a patologia entérica (Licois & Coudert, 2005). Apesar destes insucessos, atualmente é reforçada a hipótese de uma etiologia bacteriana, estando a hipótese viral praticamente revogada.

Neste estudo observamos que os coelhos com suspeita de EE, apresentam todos os sinais clínicos característicos, desde ausência de consumo de alimento, perda de peso, diarreias, aumento do consumo de água, e um aumento marcado da quantidade de *Escherichia coli* nas fezes, acompanhado por um decréscimo no número de *Enterococcus* spp. (Quadro 2).

Quadro 2: Comparação das UFC/g de *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. e Microrganismos totais a 30°C, de Cecos de coelhos com suspeita de Enteropatia Epizootica (n=3) e das fezes recolhidas no Biotério do grupo P2 ().

	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i>	M.T. 30°C
Biotério Coelhos (3-1-2012)	1,08E+09	4,30E+06	1,88E+09
Exploração B	2,48E+08	3,93E+06	4,88E+08
Exploração M	2,90E+08	1,25E+07	4,62E+07
Exploração L	1,30E+07	1,75E+05	2,75E+07

2.3. Diagnostico

No campo, o diagnóstico de EE poderá ser duvidoso, colaborando para tal as precárias condições higiénicas gerais dos pavilhões cunículas e o pouco ou nenhum controlo sanitário existente. A marcada distensão abdominal e a impactação cecal (*Fotografia 5, Anexo IV*), com grandes acumulações de líquido e gás, e uma diarreia aquosa são os sinais clínicos que auxiliam um diagnóstico mais preciso da patologia. A diminuição acentuada da ingestão de alimento é um dos primeiros sinais observados nos coelhos, mas só possível de identificar em animais em meio experimental ou em explorações mais controladas (Coudert *et al.*, 1997). Os achados da necropsia revelam ausência de lesões macroscópicas óbvias da mucosa das diferentes partes do trato digestivo, contudo um processo inflamatório agudo e congestivo do intestino delgado, ceco e intestino grosso são as únicas evidências encontradas (*Fotografia 6, Anexo IV*). Lesões histológicas da mucosa intestinal caracterizam-se por uma ligeira a moderada atrofia das vilosidades, associada a uma infiltração de células inflamatórias na mucosa. As alterações macroscópicas são uma ferramenta mais confiável para fins de diagnóstico do que os achados histológicos (Licois D., 2004).

2.4. Tratamento e Prevenção

No que respeita o tratamento e prevenção, muito poucos antibióticos são eficientes, destacando-se a tiamulina e bacitracina como as principais moléculas com alguma taxa de sucesso (Duperray *et al.*, 2000). Neste contexto, foram feitos estudos onde a bacitracina, em solução aquosa (0,657 g/l de água de bebida), era administrada em coelhos antes (prevenção) e depois (tratamento) da contaminação destes animais com um inócuo constituído por conteúdo intestinal de coelhos com suspeita EE sem agentes patogénicos oportunistas (TEC), mostrando que a administração de bacitracina era eficaz em ambos os casos, reduzindo a taxa de morbilidade e mortalidade nestes animais (Duperray *et al.*, 2000; Duperray J., 2003). Outros estudos mostraram ainda que a tilosina (macrólido de amplo espectro) poderia ser aplicada como tratamento alternativo (Maertens *et al.*, 2005). Entre todas as explorações cunículas abordadas neste estudo a empresa responsável pelo fornecimento do alimento composto era a Alimentação Animal Nanta S.A., que nas explorações onde havia indícios de patologia intestinal, ou mesmo Enteropatia Epizootica, associavam à ração antibióticos, desde macrólidos (tilosina) a polipeptidos (bacitracina e colistina) entre outros, no tratamento e prevenção da EE.

A longo prazo a antibioterapia não é a melhor solução, pelo que outras abordagens devem ser exploradas, como a aplicação de métodos nutricionais (probióticos, restrição alimentar, etc.) podendo desempenhar um papel-chave na prevenção desta patologia.

2.5. Impacto das Enteropatias nos coelhos de produção

No caso das explorações cunículas afetadas com enteropatia, a alta mortalidade foi o fator que mais se realçou, associado a uma diminuição da quantidade de alimento composto ingerido e a uma grande capacidade de disseminação entre os coelhos. Mesmo existindo antibióticos capazes de controlar a EE eficazmente, ainda é uma patologia que está associada a elevados custos económicos para o produtor. Muito embora se reconheça o progresso notável que se tem feito para controlar a EE, esta patologia ainda está “descontrolada”, com recidivas, especialmente no outono e na primavera. Focado na aplicabilidade de uma das estratégias nutricionais que são conhecidas, foi objetivo deste trabalho testar o efeito de um “auto-probiótico” na melhoria da estrutura e função do trato gastrointestinal e na prevenção da EE.

Parte II: Avaliação do impacto da utilização de um “auto-probiótico” na flora entérica e na produtividade durante a fase de crescimento

3. Probióticos e a produção animal

A produção animal tem como objetivo principal fornecer alimento seguro e de qualidade, à população humana, preservando o bem-estar animal e respeitando o ambiente. Para o produtor o objetivo passa por maximizar a produção, sendo importante que os alimentos compostos forneçam todos os nutrientes necessários para que os animais expressem todo o seu potencial e para que todas as funções fisiológicas estejam em equilíbrio com o ambiente. No passado, a produção animal era baseada na utilização de antibióticos (AB) em doses subterapêuticas, atuando como promotores de crescimento (Dibner & Richards, 2005). Os AB inibem e modificam a flora microbiana, promovendo um aumento da disponibilidade de nutrientes e da “saúde animal”, com o consequente incremento do crescimento. A preocupação do desenvolvimento de resistências aos antimicrobianos (ABR), a possibilidade da transferência de genes de resistência antibiótica dos animais para os humanos (Mathur & Singh, 2005; Salyers *et al.*, 2004), associado a um risco de saúde pública, aumentou a contestação à sua utilização (Fonseca *et al.*, 2004), e pôs fim ao uso de AB como promotores de crescimento na UE, desde 1 de janeiro de 2006 (EC 2001, 2003).

Uma das consequências da exclusão dos AB como promotores de crescimento, foi o aumento do seu uso a nível terapêutico (Casewell *et al.*, 2003). Durante muito tempo os AB além de funcionarem como promotores de crescimento, funcionavam como terapia profilática para um conjunto vasto de patologias, quer do foro intestinal, quer do aparelho respiratório ou dérmicas. Há atualmente um novo objetivo dos produtores de animais que passa pela redução do uso de AB a nível terapêutico e a procura de alternativas viáveis que possam melhorar os mecanismos de defesa dos animais e assim melhorar, também, a sua produtividade. (Verstegen & Williams, 2002). Uma dessas formas é através da utilização de aditivos alimentares específicos ou matérias-primas que afetam favoravelmente o desempenho animal e o seu bem-estar, nomeadamente através da modulação da flora microbiana intestinal, que desempenha um papel crítico na manutenção da saúde do hospedeiro (Tuohy *et al.*, 2005). Uma flora intestinal equilibrada estabelece uma barreira eficaz contra a colonização de microrganismos patogénicos, produz substratos metabólicos (e.g. vitaminas) e estimula o sistema imunitário. Probióticos, prebióticos, enzimas digestivas e ácidos orgânicos podem ser soluções exequíveis. (Choct, 2009; Williams *et al.*, 2001).

O funcionamento normal do trato gastrointestinal e a saúde da sua flora bacteriana é vital para o bem-estar do coelho, mas com um sistema digestivo tão complexo, qualquer

perturbação pode levar a um estado patológico, que rapidamente se pode tornar fatal. O aparelho digestivo dos coelhos está adaptado a uma dieta típica de herbívoro, com adaptações específicas que vão desde os característicos dentes incisivos, até a um segmento ceco-cólico muito desenvolvido e com uma flora microbiana específica que separa o conteúdo fecal, permitindo a cecotrofia. Em circunstâncias naturais há um vasto número de bactérias comensais do aparelho intestinal, essenciais à saúde e nutrição do hospedeiro com capacidade de estimular o sistema imune e promover a homeostasia intestinal (O'Hara & Shanahan, 2007).

Os géneros microbianos principais dos monogástricos, tal como o porco, o frango e o coelho são: *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* e *Propionibacterium*. A proporção da flora microbiana intestinal varia com a idade, o estado saúde, e o tipo de dieta a que estes animais estão sujeitos (Abt & Artis, 2009). A perda do equilíbrio da flora intestinal leva a um aumento progressivo da permeabilidade intestinal e, consequentemente, a um desequilíbrio da digestão e à presença de patologia (Frank *et al.*, 2007). Toxinas e outras classes de substâncias, como mucinases e adesinas, produzidas/libertadas por bactérias patogénicas interferem com o metabolismo da mucosa intestinal, provocando alterações na flora deste órgão. Um aumento das bactérias patogénicas e uma consequente diminuição das bactérias comensais do intestino, tais como as bifidobactérias e lactobacilos, que demonstraram ter a capacidade de fornecer proteção contra infeções entéricas, desempenham um papel importante na promoção e manutenção da inflamação intestinal (Andoh & Fujiyama, 2006).

3.1. Probióticos e outros aditivos alimentares

A Organização Mundial de Saúde define probióticos como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Podem ser componentes de alimentos presentes no mercado como leites fermentados e iogurtes, ou podem ser encontrados na forma de pó. Os organismos probióticos procariotas são normalmente bactérias ácido-lácticas, sendo os mais comuns os *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* spp., que ao contrário da microbiota residente, não colonizam o intestino, mas ajudam a atingir o equilíbrio das populações microbianas naturais do hospedeiro.

Para o probiótico ser eficaz e ter valor tem que ter as seguintes características: sobreviver no trato gastro-intestinal (TGI); aderir às células epiteliais intestinais ou localizar-se na mucosa intestinal temporariamente; ser resistente ao pH do suco gástrico e enzimas proteolíticas digestivas; excluir ou reduzir a aderência de patógenos; ajudar a atingir o equilíbrio das populações da microbiota normal; ser seguro, não ser invasivo, não carcinogénico e não patogénico para o animal; ter a sua eficácia comprovada, ser estável e sobreviver no produto

(Gueniche *et al.*, 2006). Entre vários mecanismos de ação propostos dos probióticos, vários autores sugerem uma diminuição das reações metabólicas que produzem substâncias tóxicas por estimulação das enzimas do hospedeiro (Hooper *et al.*, 2002), produção de vitaminas e substâncias antimicrobianas (Simon *et al.*, 2003), normalização da homeostasia microbiana intestinal (Salminen *et al.*, 1996), produção de bacteriocinas (Mazmanian *et al.*, 2008.), competição pela adesão às células epiteliais, aumento da resistência à colonização, estimulação do sistema imune do hospedeiro (Salzman *et al.*, 2003) e interferência com a capacidade de patógenos colonizarem e invadirem a mucosa entérica (Gill, 2003).

O principal objetivo dos probióticos não passa pela destruição/substituição das bactérias patogênicas, mas sim pela estimulação das barreiras naturais de defesa do hospedeiro contra bactérias patogênicas, assegurando uma função e um tempo de trânsito intestinal ótimo, de modo a garantir uma eficiente utilização do alimento composto por parte dos coelhos (Maertens *et al.*, 1994). Os efeitos benéficos dos probióticos no microbismo intestinal dependem do número de bactérias ativas que colonizam temporariamente o TGI, onde o seu tempo de semi-vida varia com o local de colonização. Segundo Guillot (2001), os organismos probióticos tem que atingir concentrações na ordem dos 10^6 a 10^7 /g no conteúdo intestinal para ter qualquer efeito observável. A idade dos animais, principalmente durante os primeiros anos de vida, torna-os mais suscetíveis a patógenos ambientais, onde uma colonização precoce do hospedeiro por bactérias é capaz de modular a expressão de genes em células epiteliais, criando um habitat favorável para a multiplicação de uma flora entérica saudável (Siggers *et al.*, 2007). A dose, altura e duração da administração dos probióticos, são fatores que influenciam a sua eficácia na prevenção de patologias e no efeito sobre a produtividade.

3.2. Alternativas para a produção Cunicula

Comparativamente a outros grupos de animais de produção monogástricos, estudos sobre o uso de probióticos na produção dos coelhos são escassos e na sua maioria antigos. Na sua grande maioria, verificou-se um aumento do ganho médio diário de peso, uma redução do índice de conversão alimentar e uma diminuição da mortalidade dos coelhos com o uso de probióticos na produção cunicula (Falcão-e-Cunha *et al.*, 2003).

Os efeitos dos probióticos no que concerne à sua capacidade de promover um equilíbrio da flora microbiana intestinal foram abordados por diferentes autores, que produziram conclusões díspares: desde não encontrarem qualquer efeito gastrointestinal (Gippert *et al.*, 1992; Luick *et al.*, 1992); um aumento da digestão de fibras após 8 a 12 semanas da administração de probióticos (Yamani *et al.*, 1992). Como os probióticos influenciam a microbiologia da flora intestinal, vários autores pesquisaram os seus efeitos sobre a microbiota cecal, seja por contagem de bactérias (Amber *et al.*, 2004) ou pela quantificação dos seus produtos: ácidos gordos voláteis (AGV), em particular (Maertens *et al.*, 1994). No estudo de

Amber *et al.* (2004), o probiótico aumentou significativamente as contagens de bactérias celulolíticas (UFC/g) enquanto, ao mesmo tempo, diminuía as contagens de agentes ureolíticos, não afetando o pH cecal. No estudo de Maertens *et al.* (1994), o probiótico “Paciflor” não afetou o pH nem os níveis de AGV no ceco.

Uma outra alternativa ao uso dos AB é a utilização de prebióticos na produção de coelhos. São essencialmente constituídos por oligossacarídeos, que não sendo digeridos pelas enzimas do hospedeiro estimulam seletivamente certas espécies de bactérias do hospedeiro, tal como bifidobactérias e lactobacilos. Estas bactérias apresentam benefícios para a saúde animal, dificultando a colonização por bactérias patogénicas. O estudo do seu uso em coelhos é reduzido e inconclusivo. Como a dieta dos coelhos é composta principalmente por alimentos fibrosos, e consequente elevadas quantidades de oligossacarídeos, a quantidade necessária de oligossacarídeos para as diferentes fases de crescimento dos coelhos podem ser rapidamente solucionadas pela escolha acertada das fibras alimentares.

A ideia de associar enzimas nos alimentos compostos já tem alguns anos, contudo o seu uso como alternativa aos AB só ocorreu a partir dos anos 80 (Choct, 2006). Antes deste período as enzimas só eram usadas em produtos de limpeza, não eram termo-estáveis, não resistiam à acidez gástrica nem aos processos digestivos do hospedeiro. As primeiras enzimas a serem acrescentadas a alimentos compostos com sucesso foram as beta-glucanases e as xilanases, que catalisam a hidrólise parcial da fibra de centeio, aveia, trigo e cevada. Os seus benefícios foram demonstrados na produção aviar, com uma maior absorção de nutrientes, uma melhor qualidade da cama e limpeza dos ovos, e uma redução dos substratos para a proliferação microbiana no íleo e ceco (Bedford, 2000), sendo desde então, o seu uso comercial generalizado. O uso na produção cunícula não tem um efeito significativo, devido à peculiar fisiologia digestiva dos coelhos e ao facto da cecotrofia projetar enzimas microbianas ao longo de todo o sistema digestivo (Marouneck *et al.*, 1995), restringindo o seu uso em determinadas fases de produção de coelhos.

Outra alternativa viável ao uso de antibióticos são os ácidos orgânicos, que possuem já um sucesso considerável principalmente na produção suína. Ácido fórmico, acético, propiónico, butírico, láctico, sórbico, fumárico, tartárico e ácido cítrico são os mais promissores (Partanen & Mroz, 1999). A acidificação dos compostos alimentares ativa enzimas proteolíticas, desnatura e desdobra proteínas para alimentação animal, e têm um efeito de proteção contra microrganismos presentes na ração. Não há muitos estudos que apoiem o uso de ácidos orgânicos nos coelhos, contudo alguns autores demonstraram que a adição de 1,5 % de ácido fumárico à ração dos coelhos, parece melhorar o seu ganho médio diário (GMD), bem como a conversão alimentar, contudo são resultados ainda preliminares (Scapinello *et al.*, 2001; Michelin *et al.*, 2002; Hollister *et al.*, 1990).

4. Material e Métodos (I)

4.1. Biotério Coelhos

Dois grupos de 6 coelhos com 37 dias de idade, um grupo com alimento composto com antibiótico (Grupo A) e outro grupo com alimento composto sem AB mas com a inoculação de probiótico (Grupo P), chegaram ao ICBAS no dia 22 de dezembro de 2011 por volta das 18h (*Fotografia 17, Anexo IV*), provenientes da exploração cunícula M, onde um estudo de campo com os mesmos probióticos estava a ser conduzido. À sua espera estava uma sala de biotério pré-aquecida a 17°C e uma humidade relativa de 80 %. Todos os coelhos foram pesados e divididos por duas jaulas separadas. A jaula do grupo P tinha sido previamente aspergida com o probiótico horas antes dos coelhos chegarem. Durante 5 dias, ambos os grupos receberam água ad libitum (rede pública do Porto) e alimento composto. O alimento composto para a fase de crescimento dos coelhos foi fornecido pela Alimentação Animal Nanta S.A., sendo constituído por: 30% de Trigo, 19% Girassol, 15% Luzerna, 15% Polpa beterraba, 8% Polpa citrinos, 5% palmiste, 3% Melaço e 2% de Palha. O grupo A tinha ainda suplementado os antibióticos: Colistina, Oxitetraciclina e Valnemulina (EcoNor®), no alimento composto. No dia 26 de dezembro de 2011 os coelhos foram divididos em 4 grupos. Os grupos antibiótico A1 e A2 (*Fotografia 18, Anexo IV*), e os grupo probiótico P1 e P2 (*Fotografia 19, Anexo IV*), separados em quatro jaulas distintas, onde cada conjunto do mesmo grupo se encontrava na mesma torre de jaulas (*Fotografia 20, Anexo IV*). Os grupos A (A1 e A2) e os grupos P (P1 e P2) foram mantidos nas mesmas condições experimentais, variando unicamente a posição dos coelhos na torre de jaulas, a presença de antibiótico no alimento composto e o fornecimento de probiótico.

Todos os coelhos foram devidamente identificados com marcador no pavilhão auricular. Durante as três semanas seguintes, o valor médio de coelho/jaula de consumo de água e consumo de ração foram registados todas as 24h. Todos os animais foram individualmente pesados de 48h em 48h.

O probiótico foi administrado duas vezes por semana individualmente a cada coelho dos grupos P (P1 e P2) com o auxílio de uma seringa. Antes de cada inoculação as colónias eram preparadas no dia anterior mediante incubação em Muller Hilton (M-H) (Oxoid®, Reino Unido) a 37°C durante 24h das espécies e estirpes seleccionadas (*Figura1, anexo I*). O Probiótico era preparado no dia, num frasco com 50 mL de Água Peptonada Tamponada (APT) (Oxoid®). Com o auxílio de uma Zaragatoa retirávamos proporções equivalentes das bactérias, que se encontravam nas placas de M-H, para o frasco de APT. Foram inoculados aproximadamente cerca de 3 mL do preparado probiótico a cada coelho.

Os 17 isolados bacterianos utilizados na preparação do probiótico foram recolhidas aleatoriamente das fezes de coelhos saudáveis de uma exploração cunícula, tendo sido

incluídas três estirpes de *E. coli* (a₁, a₂ e b₁) (Fotografia 21, Anexo II), quatro estirpes de *Enterococcus* spp. (a₃, a₄, b₂ e b₃) (Fotografia 22, Anexo II), seis estirpes recolhidas em MRS (c₁, c₂, c₃, c₄, c₅ e c₆) (Fotografia 23, Anexo II), e quatro recolhidas em M17 (b₆, c₉, a₅ e a₆) (Fotografias 24 e 25, Anexo II). Com base na coloração Gram, testou-se o fenótipo de resistência de todos os isolados. Estes resultados são apresentados no Quadro 3, Anexo III. Durante a primeira semana, as duas primeiras administrações do probiótico incluíram todas as estirpes referidas. Na avaliação dos resultados de análise microbiológica de cecos provenientes de coelhos com suspeita de Enteropatia Epizoótica (Quadro 2), apoiado com os dados do estudo de campo na exploração M com os mesmos probióticos utilizados neste trabalho, verificou-se um aumento significativo no número de Unidades Formadoras de colónias (UFC) de *E. coli* por grama de conteúdo cecal/fezes. Consequentemente nas administrações de probiótico que se seguiram, foram excluídas as estirpes de *E. coli* (a₁, a₂ e b₁).

A recolha de fezes e respetiva análise microbiológica ocorreram duas vezes por semana. Os coelhos abandonaram as instalações no dia 16 janeiro de 2012, com 62 dias de idade, tendo sido levados para uma exploração doméstica, onde no dia 26 de janeiro de 2012 a última amostra de fezes foi recolhida. A sala de biotério esteve sempre a uma temperatura de aproximadamente de 18 a 19°C, sempre com a ventilação ligada com extração de ar. A limpeza dos tabuleiros de recolha de fezes era feita duas vezes por semana. A limpeza da sala do biotério era feita uma vez por semana.

4.2. Processamento microbiológico das fezes e cecos de Coelho

As fezes/conteúdo cecal depois de recolhidos foram imediatamente processados no laboratório. De cada amostra recolhida pesaram-se 10 g e adicionaram-se 90 mL de APT à temperatura ambiente. De seguida a suspensão foi homogeneizada no “Stomacher, e deixada a repousar à temperatura ambiente, durante 1h em cima da bancada do laboratório. Posteriormente, efetuaram-se diluições decimais usando oito tubos com 10 mL de Tryptone Soya Agar (TS) (Oxoid®), procedeu-se à preparação das diluições a partir da suspensão inicial, até atingir a diluição de 10⁻⁷.

Através da técnica de inoculação por gota (20 µl), foram efetuadas contagens de *E. coli* em meio TBX ágar (TBX) (Oxoid®), de enterococos em meio *Slanetz and Bartley Medium* (S-B) (Oxoid®) e de microrganismos aeróbios mesófilos totais em meio *Plate Count Agar* (PCA) (Oxoid®) (Figura 2, Anexo I). Depois das placas secarem a temperatura ambiente, foram colocadas na estufa a 37°C as placas de TBX e S-B, respetivamente durante 24h e 48h, e na estufa a 30°C as placas de PCA, durante 72h. Após o tempo de incubação efetuou-se a contagem das colónias presentes em cada inócuo (Fotografias 26, 27 e 28, Anexo I), com o auxílio de uma lupa, e registado o seu valor. Os ensaios foram realizados em duplicado.

5. Resultados

Os coelhos chegaram ao ICBAS com um peso médio de 1,07 kg. Durante todo o período de experimentação os animais não apresentaram sinais de doença, com a exceção dos dois grupos P, que apresentaram aos 43 dias de idade (6 dias depois da chegada) sintomatologia digestiva, suspeita de Enteropatia Epizootica, com diarreias, quebra no consumo de alimento, aumento do consumo de água e perda de peso. Na *Fotografia 29, Anexo IV*, é possível observar a presença de sinais de diarreia na jaula dos coelhos do grupo P2. Este estado prolongou-se durante 4 dias, não se efetuando qualquer tipo de tratamento aos coelhos dos dois grupos P. Este acontecimento influenciou, no período acima indicado, todos os valores obtidos dos vários parâmetros avaliados nos grupos P, principalmente no grupo P2. Desde o início da experiência as fezes dos coelhos submetidos à inoculação do probiótico apresentaram um cheiro frutado característico e uma consistência mais mole, comparativamente com as fezes do grupo A.

A evolução do peso médio ao longo do período experimental está descrito na *Figura 3, Anexo III*. No início, ambos os grupos apresentaram um peso médio idêntico, contudo a partir dos 44 dias de idade os animais do grupo P cresceram a um ritmo mais lento, o que se prolongou até aos 47 dias de idade. Esta diferença está evidente no *Gráfico 1, Anexo III*, em que no mesmo período, o grupo P teve um crescimento médio muito próximo de zero. O grupo P2 foi aquele que teve mais coelhos a apresentarem menor crescimento (*Figura 3, Anexo III*). Após o período de quebra, houve uma recuperação por parte dos coelhos do grupo P, concretizada a partir dos 55 dias de idade, onde apresentaram um pico de crescimento, estabilizando no final do período experimental. O crescimento médio dos dois grupos está exposto no *Gráfico 1, Anexo III*. Os animais do grupo A apresentaram um crescimento médio diário relativamente constante, com valores a rondar os 50 g de ganho de peso, ao longo de toda a experiência. Os grupos P tiveram um crescimento médio muito variável, como já descrito anteriormente.

Relativamente ao consumo médio de água e alimento composto, os valores apresentados nas *Figuras 4 e 5, Anexo III*, demonstram um maior consumo médio de água para os animais do grupo P, e um maior consumo médio de alimento composto para os animais do grupo A. No período experimental em que os coelhos do grupo P apresentaram crescimento inferior, já referido, nota-se um evidente abaixamento no consumo de alimento composto, acompanhado por um aumento do consumo de água, como observável no *Gráfico 3, Anexo III*. O grupo A apresenta um consumo médio de alimento composto e de água crescente em relação à idade.

Houve uma clara recuperação do consumo de alimento composto por parte dos animais do grupo P no final do período experimental, coincidente com um grande incremento no

crescimento apresentado nesse período. O *Gráfico 3, Anexo III*, descreve o quociente entre consumo médio de água e o consumo médio de alimento composto nos dois grupos experimentais, verificando-se que este quociente foi em quase todo o tempo superior no grupo P. Todavia é também evidente que a relação entre o consumo médio de água e alimento foi no grupo P mais elevada no período em que os animais apresentaram sinais de enteropatia, baixando nos dois períodos em que os coelhos deste grupo revelaram maior recuperação no peso.

A conversão alimentar média apresentada pelos dois grupos está expressa no *Gráfico 2, Anexo III*. Ambos os grupos apresentaram um índice de conversão alimentar (médio) entre 3 a 3,5. Houve um claro pico no índice de conversão alimentar no período de quebra do crescimento, já referindo anteriormente, para os animais do grupo P. Após este pico, os valores de conversão alimentar mantiveram-se muito idênticos ao longo de todo o período experimental. No final do período experimental os animais do grupo P apresentam um ligeiro decréscimo no índice de conversão alimentar, justificável pelos dados já descritos de crescimento e peso médio dos animais nesse período.

Durante o estudo recolheram-se amostras de fezes dos quatro grupos, para análise microbiológica das mesmas. O número de *E. coli* nas fezes dos coelhos dos quatro grupos estão expressas na *Gráfico 5, Anexo III*. Há um claro aumento no número de *E. coli* no início da experimentação, principalmente no grupo P2, evidente aos 49 dias de idade, e em menor proporção no grupo P1. Este elevado número de UFC/g foi reduzindo ao longo do período experimental, até atingir valores mais estáveis no final. As contagens de UFC/g para os coelhos do grupo A mantiveram-se mais regulares ao longo de toda a experiência.

Com os resultados obtidos da análise microbiológica dos *Enterococcus* spp. *Gráfico 6, Anexo III*, pode-se inferir que, à semelhança de *E. coli*, as contagens iniciais do grupo P, principalmente do P2, apresentaram valores elevados, com um pico aos 52 dias de idade. Houve uma clara diminuição no número de *Enterococcus* spp. em todos os grupos ao longo do período experimental, com valores superiores no início no grupo A1. Em conformidade com as contagens de *E. coli*, os quatro grupos (A1, A2, P1 e P2) apresentaram para os enterococos valores muito baixos e constantes no final da experiência.

As contagens do número de Microrganismos Totais (M.T.) acompanharam o resultado das contagens de *E. coli* e *Enterococcus* spp. (*Gráfico 4, Anexo III*).

No *Quadro 2*, estão expostos os resultados obtidos da análise microbiológica de três amostras de conteúdo cecal de coelhos provenientes de explorações distintas com suspeita de Enteropatia Epizootica (*i.e.*, os coelhos apresentaram diarreia aquosa e distensão abdominal). Os resultados obtidos mostram contagens de *E. coli* muito elevadas. Curiosamente com valores próximos aos observados na amostra do dia 3 de janeiro de 2012 recolhida no grupo

P2. Também à semelhança do sucedido no Biotério, as contagens de *Enterococcus* spp. acompanharam os valores de *E. coli*, contudo com um número de UFC/g mais baixo.

Segundo Michelland *et al.* (2009), as bactérias presentes nos cecos dos coelhos são similares às presentes nas fezes, podendo-se usar estas últimas para inferir nas variações da comunidade de bactérias cecais no coelho.

Os resultados observados no estudo de campo efetuado com o mesmo probiótico, obteve resultados similares, quando os coelhos do grupo probiótico apresentaram sinais de EE, a partir do dia 15 de Novembro de 2011 (N6) (Gráfico 7, Anexo III).

6. Discussão/Conclusão Probióticos e Enteropatia Epizoótica

Todos os animais chegaram ao final da experiência em boa condição física, e saudáveis. Houve uma clara quebra das performances produtivas por parte dos coelhos do grupo P, devido ao aparecimento de patologia de foro intestinal, com suspeita de Enteropatia Epizoótica.

Após um decréscimo no consumo de alimento composto, e consequente quebra no crescimento, houve um período de recuperação, conseguindo aproximar-se do peso médio final dos animais do grupo A. Seria expectável que havendo continuidade desta experiência, os animais do grupo P iriam ultrapassar o peso dos animais do grupo A.

Os animais abandonaram as instalações do biotério com 62 dias de idade, apresentando uma média de peso de 2230 g para o grupo A, e de 2169 g para o grupo P. No final do período experimental houve uma estabilização dos valores médios do crescimento e do índice de conversão alimentar, onde os animais do grupo P apresentavam valores de crescimento médio superiores e índices de conversão mais baixos, corroborando uma clara recuperação dos animais do grupo P, podendo deduzir uma performance produtiva idêntica dos animais com probiótico e antibiótico aos 70 dias de idade, correspondente à idade de abate mais frequente, assumindo um crescimento constante e a ausência de patologias

Durante os 25 dias do período experimental, os coelhos do grupo A tiveram um incremento de 1160 g de peso médio (Peso final – Peso inicial) com um consumo médio de alimento composto suplementado com antimicrobianos de 3322 g; o grupo P obteve 1099 g de incremento peso médio e um consumo médio de 3033 g alimento composto. Se os coelhos em vez de serem encaminhados para uma exploração doméstica, tivessem sido enviados para abate, efetuando um cálculo do rendimento económico alcançado durante a fase de crescimento, tendo como base a informação económica prestada pela Alimentação Animail Nanta S.A. (janeiro 2012): 1 tonelada de alimento composto custa 300 €; antimicrobianos por tonelada de alimento composto custam 31 €; e um valor de 1,70 €/kg de peso vivo (ASPOC - janeiro 2012), os coelhos do grupo A teriam um rendimento médio de 0,87 € por coelho, enquanto o grupo P um rendimento médio de 0,96 € por coelho, considerando unicamente os gastos de alimentação como os únicos custos associados ao crescimento dos coelhos. Numa

exploração pequena esta diferença não é muito significativa, contudo numa exploração com 700 reprodutoras, com uma média de 8 partos num ano e uma média de 8 láparos por coelha na fase de crescimento, a diferença de rendimentos na exploração entre o uso de alimento composto suplementado com antimicrobianos e o uso de probióticos, como substituto dos AB, atingiria um valor de 4032 € num ano, contabilizado como custos de produção unicamente a alimentação dos animais. Os coelhos do grupo P, neste estudo, demonstram ser mais rentáveis para um produtor cunícula, além de desempenharem um papel importante nas populações em termos de saúde pública.

As contagens muito elevadas de *E. coli*, acompanhadas pelas de *Enterococcus* spp., nas amostras recolhidas aos 49 e 52 dias de idade, respetivamente, estão diretamente associadas à sintomatologia apresentada pelos animais dos grupos P, principalmente P2: diarreias, perda de peso e diminuição do consumo de alimentos compostos. O stress dos animais no transporte até ao biotério, a idade dos mesmos (pós-desmame) e o stress associado à adaptação ao novo local/ambiente/microbismo são fatores que podem explicar as contagens elevadas de *E. coli*, *Enterococcus* spp. e M.T. nos animais do grupo P (especialmente do grupo P2), no início da experiência. A coincidência das contagens microbianas (sempre muito elevadas) entre as fezes do grupo P e o conteúdo cecal de coelhos com Enteropatia Epizootica, corroboram a existência de um quadro de Enteropatia Epizootica no período de 29 de dezembro de 2011 (44 dias de idade) a 1 de janeiro 2012 (47 dias de idade), possivelmente associado a uma diminuição das defesas dos animais devido ao transporte e por se apresentar em idade de desmame. O que demonstra a melhor eficácia dos AB para estabilizar a microflora digestiva nestas circunstâncias. Infelizmente não existem critérios analíticos para demonstrar a EE em coelhos, porque o facto dos coelhos do grupo A (e em certa medida, também os do grupo P1) não apresentarem nem sinais de enteropatia nem alterações relevantes nas contagens microbianas, demonstram que não houve verdadeira EE no grupo P2 ou, então, a designação “epizootica” está mal aplicada a esta patologia em virtude de coelhos co-habitantes de animais afetados não terem apresentado quais quer sinais.

Os animais com antibiótico foram aqueles que menos variaram ao longo de toda a experiência.

Sendo o principal objetivo dos probióticos a estimulação das barreiras naturais de defesa do hospedeiro contra bactérias patogénicas e promover a estabilização da flora intestinal dos coelhos, verificou-se uma maior suscetibilidade a patologias digestivas conforme se pode constatar da grande variabilidade dos valores de crescimento e conversão alimentar ao longo da experiência para os animais do grupo P. Fixando a análise nos resultados finais, o crescimento e o índice de conversão alimentar favoráveis para o grupo P, podemos concluir que os probióticos têm um potencial que pode e deve ser explorado na produção cunícula. É de evidenciar que independentemente do controlo ambiente, as patologias são um importante

entreve na utilização de um probiótico, pois estes não estão ainda suficientemente desenvolvidos para garantirem uma melhor resistência às diversas patologias de foro intestinal, como a Enteropatia Epizootica. Provavelmente esta nunca virá a ser a função dos probióticos, da mesma maneira que os antibióticos não deveriam ser empregues para substituir a biossegurança ou o bom manejo.

É importante realçar, que os animais foram mantidos num ambiente controlado, desde temperatura a humidade, e que sendo um pequeno grupo experimental, a verdadeira proporção de uma produção cunícula não pode ser reproduzida. Todavia é ainda bastante prematuro fazer um estudo em grandes explorações.

Faltou também neste trabalho a existência de um grupo Controlo, *i.e.*, sem antimicrobianos e sem probiótico. Este grupo teria proporcionado uma interpretação mais completa dos resultados.

Parte III: Monitorização da qualidade microbiológica da água em explorações cunícolas

7. Água e produção cunícola

A água é um recurso essencial à vida, indispensável para a humanidade mas também para os outros seres vivos e organismos, fundamental na manutenção da integridade e funções dos ecossistemas (Ferreira, 2010). Para além de ser um elemento fundamental para um desenvolvimento sustentável dos países, onde uma boa qualidade de água se traduz numa boa qualidade de vida das populações. A qualidade da água é de máxima importância para um triunfo económico e social, e neste caso na produção animal, especificamente na produção cunícola. A atividade humana direta ou indiretamente, é a principal responsável pela diminuição da qualidade da água, tornando-a imprópria para determinados fins, isto é, diminui a quantidade e a qualidade de água usada em atividades de produção. O conceito de qualidade da água é relativo, já que depende do uso a que se destina ou do objetivo dado pelo seu utilizador. A qualidade da água é definida, para fins específicos, como o conjunto de características físicas, químicas e biológicas adequadas à sua utilização para determinado uso. Para cada uso da água é necessário estabelecer as exigências relativas à sua qualidade, isto é, definir parâmetros de qualidade e estabelecer os seus valores-limite (Ferreira, 2010).

Na União Europeia (UE) não existe atualmente nenhum regulamento específico para controlo de qualidade microbiológica, e química, das águas a administrar aos animais de produção. Contudo existe legislação específica para as águas de consumo humano. Segundo o Decreto-Lei 243/2001 de 5 de Setembro, que regula a qualidade da água destinada ao consumo humano e tem por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes de qualquer contaminação da água destinada ao consumo humano, assegurando a sua salubridade e limpeza. Como o objetivo primordial das sociedades atuais é assegurar a qualidade da água para consumo humano, a água destinada ao consumo humano é definida como: a) toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais; b) toda a água utilizada numa empresa da indústria alimentar para o fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinadas ao consumo humano, exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada, cabendo à Direção Geral de Saúde (DGS) a lista das utilizações nas indústrias alimentares, em que a salubridade do produto final não é afetada pela qualidade da água utilizada. A água destinada ao consumo humano deve ser assim salubre e limpa, competindo assim à entidade gestora assegurar que a água destinada ao consumo humano satisfaça as exigências de qualidade constantes no

Quadro 4, que faz parte integrante do diploma, não podendo, em caso algum, apresentar sinais de deterioração da sua qualidade.

Quadro 4: Parâmetros microbiológicos para a água de consumo humano, segundo «Diretrizes para a qualidade da água potável» da Organização Mundial da Saúde.

Parâmetros microbiológicos

1 — Para a água destinada ao consumo humano fornecida por sistemas de abastecimento público, redes de distribuição, camiões ou navio-cisterna, ou utilizada numa empresa da indústria alimentar:

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidades
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	0	Número/100 ml
Enterococos	0	Número/100 ml

2 — Para as águas postas à venda em garrafas ou outros recipientes:

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidades
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	0	Número/250 ml
Enterococos	0	Número/250 ml
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0	Número/250 ml
Número de colónias a 22°C	100	Número/ml
Número de colónias a 37°C	20	Número/ml

No caso das explorações cunículas, onde na maioria o fornecimento de água provem de poços, furos privados, a autoridade competente determina a isenção da aplicação das normas constantes no diploma atrás referido, pois não existe qualquer regulamentação para controlo da qualidade de água quer microbiológica, quer química nas produções de animais.

Contudo vários autores defendem que a água destinada ao consumo animal deve ter as mesmas características microbiológicas e químicas da água potável consumida pelos seres humanos, com baixo nível de iões cálcio e magnésio em solução e pH entre 6 e 8. Uma produção animal de qualidade dá à água uma importância semelhante, ou mesmo superior, à que se dá a outros fatores de produção, como às instalações, alimentação e manejo (Viana, 1978).

7.1. Controlo microbiológico da água

A qualidade microbiológica da água de consumo é avaliada através de indicadores bacterianos de poluição fecal, provenientes do metabolismo dos animais homotérmicos, estando a sua concentração relacionada com o grau de poluição fecal da água.

O número de microrganismos presentes na matéria fecal é muito elevado, dos quais somente alguns são patogénicos, sendo na sua maioria comensais do aparelho digestivo do hospedeiro. Em virtude de serem simultaneamente microrganismos patogénicos e não patogénicos, ou de patogenia limitada, a presença ou ausência dos mais abundantes microrganismos entéricos (maioritariamente não patogénicos) indica se a água em questão foi ou não contaminada por fezes, isto é, se apresenta o perigo de conter microrganismos fecais patogénicos.

A escolha dos indicadores de qualidade microbiológica da água obedece a vários critérios, entre eles: (1) a concentração do microrganismo indicador na água contaminada deve ter uma relação direta com o grau de contaminação fecal; (2) o microrganismo indicador deve ser suficientemente conhecido, de forma a permitir a atribuição de valores-limite; (3) devem existir em número superior aos microrganismos fecais patogénicos; (4) não deverá reproduzir-

se em meio aquático, após desinfecções; (5) deve distribuir-se de forma aleatória na massa de água; (6) não deverá ter o seu crescimento inibido pelo crescimento de outros organismos; (7) a sua análise deve ser rápida, inequívoca e de baixo custo; (8) as técnicas laboratoriais de identificação deverão ter uma grande especificidade e sensibilidade e ser passíveis de detetar baixos níveis do indicador; (9) o microrganismo indicador deve ser mais resistente aos agentes desinfetantes que os microrganismos patogénicos; (10) deverá ser apropriado para a análise de todos os tipos de água; (11) deverá ser inofensivo para o ser humano (Ferreira, 2010).

Entre os indicadores clássicos de contaminação fecal, têm vindo a ser utilizados o grupo dos coliformes fecais e não fecais, os *Streptococcus* fecais do grupo D, e mais tarde o grupo dos *Enterococcus* spp., *Clostridium perfringens*, e o número total de microrganismos com crescimento a 22°C e a 37°C. Além das bactérias fecais outros microrganismos estão presentes na água, como vírus, helmintas e protozoários, que podem representar perigos para as populações animal, mas não fazem em geral parte da análise microbiológica.

7.1.1. Coliformes

O grupo dos coliformes é constituído por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, habitantes do aparelho intestinal do homem e de outros mamíferos, correspondendo a cerca de 10% dos microrganismos presentes no intestino destes seres vivos. São bactérias Gram-negativas, em forma de bacilo, não esporuladas e oxidase-negativa, que crescem em condições aeróbias ou anaeróbias facultativas, em meio de cultura seletivo contendo sais biliares. São capazes de sintetizar a enzima β -galactosidase, e de fermentar lactose a 35 - 37°C com libertação de gás, ácido e aldeído em 24 a 48h.

Tradicionalmente o grupo coliforme é constituído pelos géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Edwardsiella*. É um grupo heterogéneo, pois inclui bactérias que fermentam a lactose, como *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*, que podem ser encontradas nas fezes, no solo, e em água rica em nutrientes. Existem também espécies que têm uma origem ambiental, não fecal, como solos e vegetações e que podem mesmo crescer em ambientes aquáticos, como as bactérias coliformes *Serratia fonticola* e *Klebsiella terrigena*, que são comumente encontradas nas águas. Estão incluídos também neste grupo os géneros *Budvicia* e *Rahnella*, que nunca estão presentes nas fezes dos mamíferos.

A diferença entre coliformes fecais, ou mais corretamente, coliformes termotolerantes dos não fecais perpetua-se na capacidade destes fermentarem lactose a 44,5°C, sendo constituídos, na sua grande maioria, pelo género *Escherichia coli* e, numa proporção mais reduzida, pelos géneros *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, que são encontrados nas fezes, mas também em ambientes extraintestinais como solos e águas (Edberg *et al.*, 2000).

Escherichia coli é um coliforme termotolerante, pertencente a família *Enterobacteriaceae*, que está sempre presente nas fezes dos mamíferos e aves em grande número, não sendo encontrada em águas ou solos não expostos a uma contaminação fecal (Fujioka *et al.*, 1999). Historicamente foi o primeiro indicador da contaminação fecal tanto da água tratada como da não tratada. Caracterizada pela presença da enzima β -galactosidase e β -glucuronidase, tem a capacidade de fermentar a lactose ou manitol a $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24h, e produz indol a partir do triptofano. É uma bactéria catalase-positiva, oxidase-negativa, não usa citrato, não produz H_2S ou lipase, e não hidrolisa a ureia (Williams & Wilkins, 1994).

E. coli é o único biótipo da família *Enterobacteriaceae* que é exclusivamente de origem fecal (Edberg *et al.*, 2000), representando até 95% da família de bactérias *Enterobacteriaceae* presentes nas fezes (aproximadamente 10^9 UFC/g) (Waite, 1985). Sendo essencialmente uma bactéria comensal algumas estirpes podem ser patogênicas, causando toxinfecções alimentares e diversas infecções extra-intestinais, como pneumonias, meningites, septicémias, infecções do trato urinário. A sua frequência, patogenicidade e impacto económico são equiparáveis às de outros microrganismos patogénicos.

Devido à presença da enzima β -galactosidase é possível detectar, numa única etapa e eficazmente, a presença de bactérias coliformes termotolerantes através substratos fluorogénicos ou cromogénicos. Bioquimicamente *E. coli* formam colónias lactose-positivas, oxidase-negativas, indol-positivas (apresentam cor vermelha à superfície do meio com 0,2 a 0,3 ml de reagente Kovacs), apresentam fluorescência à luz ultravioleta no meio de cultura MUG (por hidrolisar o 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronidase) formam colónias azuis no meio TBX ágar (*Tryptone Bile X-Glucuronide*) a $44,5^\circ\text{C}$.

A espécie bacteriana *E. coli* é a preferida como indicador de contaminação fecal recente, contudo também é utilizada como indicador da eficácia do tratamento, embora como outros indicadores coliformes é sensível a desinfecção, principalmente se compararmos com vírus e protozoários.

7.1.2. Enterococcus

Os enterococos são cocos Gram-positivos, que se agrupam aos pares ou em cadeias curtas. São catalase-negativos e oxidase-negativos, não esporulantes, capazes de crescer em condições aeróbias, ou anaeróbias facultativas, em meio de cultura contendo maltose ou lactose como fonte de carbono e energia, e em soluções com Azida de sódio (inibe o crescimento de bactérias Gram-negativa). A sua propensão para crescer em meios com 6,5 % de cloreto de sódio (NaCl) em pH alcalino e a uma temperatura de 45°C , bem como a sua capacidade de hidrolisar a esculina na presença de 40% sais biliares, juntamente com o teste da catalase, possibilita o seu isolamento e identificação eficaz e preciso.

Os meios mais comuns utilizados no seu isolamento são o *Slanetz-Bartley medium* (S-B)

e o *Kanamycin aesculin azide agar* (KAA). A sua grande resistência aos agentes físicos, permite-lhes crescer e sobreviver em ambientes hostis, tornando a sua presença comum em quase todos os produtos biológicos e ambientais, desde solos, alimentos, águas, e animais. A sua presença nas fezes atinge valores na ordem dos 10^6 UFC/grama.

Enterococcus Faecalis e *Enterococcus Faecium* são as espécies mais abundantes. Até um passado recente, o seu poder invasivo e patogénico era bastante escasso, no entanto o uso generalizado de antimicrobianos tem modificado substancialmente a sua relação com o homem. A elevada resistência a ação de detergentes e as resistências natural e adquirida aos antibióticos, confere vantagem em ambientes onde o uso de antibióticos é frequente.

Os enterococos são comensais do trato intestinal e no aparelho urinário de seres humanos e animais de sangue quente, sendo usados também como indicadores da contaminação fecal em água. Os enterococos de origem fecal não se multiplicam na água, porém são mais resistentes ao stress ambiental do que *Escherichia coli*, e bactérias coliformes em geral, persistindo durante muito tempo no ambiente, particularmente nas águas, sendo usados como indicadores de uma contaminação antiga naquele recurso hídrico (WHO, 2008).

7.1.3. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens é uma bactéria Gram-positiva, em forma de bacilo, anaeróbica, esporulada que reduz sulfito em sulfureto. É um membro dos “*clostridium sulfito redutor*”, não móvel, com a capacidade de fermentar a lactose, reduzir o nitrato e liquefazer gelatina. A maioria dos clostridiuns são bactérias ambientais, muitas são saprófitos, habitando no solo, água e em matéria orgânica.

O *Clostridium perfringens* é um habitante do intestino do homem e de animais homotérmicos. Representa cerca de 95% dos organismos anaeróbios redutores de sulfito, presentes nas fezes e águas residuais, mas em menor número do que os coliformes e que os enterococos fecais. Esta bactéria foi usada como indicador de poluição fecal antiga, devido ao seu longo tempo de permanência na água e à grande capacidade de sobrevivência dos seus esporos ao tratamento convencional de cloro nas águas (Ferreira, 2010). Atualmente não é usada na avaliação microbiológica das águas de consumo, sendo sido substituído pelos *Enterococcus* spp.

7.1.4. *Microrganismos Totais a 22°C e 37°C*

O número de UFC a 37°C e 22°C permite uma contagem das populações bacterianas heterotróficas na água. Não é usado como um indicador específico de contaminação fecal, embora historicamente, a contagem a 37°C foi tomada para dar uma indicação de contaminação fecal. São de pouca importância sanitária, porém são úteis na avaliação da eficiência do tratamento das águas, dos processos de filtração, da qualidade da desinfecção e

coagulação, principalmente nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR). São muito úteis na avaliação da limpeza e integridade do sistema de distribuição de águas no fabrico de produtos alimentares e bebidas, e na produção alimentar, neste caso na produção cunícula, onde o objetivo é manter as contagens tão baixas quanto possível.

Na água ainda podemos encontrar outros microrganismos, como helmintos ou mesmo protozoários, que podem representar um perigo para a saúde dos humanos e animais. Com a evolução e aprofundamento dos estudos microbiológicos, atualmente utilizam-se novos indicadores a adicionar aos indicadores clássicos. A bactéria *Escherichia coli* substituiu, na legislação atual, os coliformes fecais como indicadores de contaminação fecal. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é outro dos chamados novos indicadores. Não é um habitante específico do intestino mas aparece em 12 % da população. É uma bactéria oportunista, aeróbia, Gram-negativa, patogénica e com elevada resistência a antibióticos (Ferreira, 2010).

Entre os vários testes analíticos para avaliação da qualidade da água, o mais eficaz e o mais comum é a técnica de filtração em membrana, onde a amostra de água passa através de uma membrana com poros de 0,45 µm de diâmetro, que posteriormente é colocada na superfície de meios de cultura sólidos, seletivos para o grupo de bactérias a quantificar. Os resultados são expressos em Unidades Formadoras de Colónias (UFC) por 100 mL de amostra de água. Esta técnica é aplicável essencialmente a águas de abastecimento, águas naturais de superfície ou subterrâneas, com uma turvação reduzida. A sua prática implica o uso de uma lupa para quantificar as UFC na superfície da membrana, sendo uma técnica de fácil execução e custo moderado.

7.2. Desinfeção e Sanitização das águas de consumo dos coelhos

“A desinfeção da água assegura a proteção contra o risco de contrair doenças infecciosas de origem hídrica, sendo este um objetivo prioritário e indispensável” (IRAR, 2007), para os seres humanos como para a produção animal. A desinfeção da água pode ser feita através de processos físicos, como a ebulição ou radiação ultravioleta, ou químicos, como o cloro, dióxido de cloro, monoclaramina e o peróxido de hidrogénio. Qualquer dos métodos apresenta vantagens e desvantagens, sendo o cloro o desinfetante mais utilizado e o peróxido de hidrogénio o novo produto em voga na produção cunícula.

7.2.1. Cloro

O uso de cloro no tratamento da água tem como objetivo principal a desinfeção (destruindo microrganismos patogénicos) e a oxidação dos compostos presentes na água. O cloro e seus compostos são fortes agentes oxidantes, diminuindo o seu poder reativo com o aumento do pH e a diminuição da temperatura (Bazzoli, 1993). O cloro reage rapidamente em contato com compostos inorgânicos, como sulfitos, sulfetos e nitritos. Por outro lado, em

contato com compostos orgânicos, necessita de várias horas para reagir. A reação do cloro com alguns compostos orgânicos origina subprodutos da desinfecção, entre eles de trihalometanos, como o clorofórmio, que são tóxicos e agentes cancerígenos para humanos e animais (Souza *et al.*, 2008).

Nas explorações cunículas o cloro é um dos principais desinfetantes utilizados, normalmente em forma de pastilhas, colocadas nos reservatórios de água da exploração (*Fotografias 30 e 31, Anexo VI*). Além de terem um poder oxidativo e desinfetante provado, a fácil dosificação, fácil colocação nos reservatórios e o seu baixo preço, tornaram-no um produto popular entre os produtores. O cheiro e o sabor característico que confere às águas, bem como a dificuldade do produtor quantificar a proporção de desinfetante que tem nas tubagens, associado ao baixo tempo de semi-vida, ao perigo cancerígeno e a sua baixa eficácia, comparada com outros produtos presentes no mercado como o peróxido de hidrogénio, tornam-no num produto de risco, que só compensa ser usado pelo seu baixo custo e facilidade de aquisição.

7.2.2. Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio é um agente oxidante, que durante anos foi muito usado unicamente no tratamento de efluentes (Ayling & Castrantas, 1981). Atualmente ainda é usado no tratamento de efluentes, mas como apresenta um elevado poder biocida - extremamente reativo em contato com a matéria orgânica - está em voga o seu uso na sanitização das canalizações de água de consumo na produção animal. Mais estável em condições ácidas do que alcalinas, perde o seu potencial de oxidação a valores de pH superiores a 5 (Neyens & Baeyens, 2003), mas também a pH muito baixos ($\text{pH} < 2$) (Cruz, 2000). É efetivo com matéria orgânica, elimina biofilmes, não é corrosivo e é estável a qualquer temperatura, não alterando o sabor da água nem deixando odores.

A concentração a que é usada depende do uso a que se destina, usado em modo continuo nas águas de consumo dos coelhos numa concentração de 30 ppm (30 ml de peróxido para 1000 L de água) aumentando para 50 ppm nas tubagens e canalização, de modo a exercer um fator de sanitização e desinfecção. Em presença de águas muito alcalinas há no mercado formulações associados com acidificantes. As formulações de peróxido de hidrogénio existentes no mercado já estão previamente preparadas para o uso a que se destinam, atuando em sinergia com ácidos orgânicos, estabilizantes e surfactantes, variando unicamente a proporção de peróxido em cada produto. Há no mercado vários produtos específicos utilizados para o tratamento das águas de consumo dos coelhos e para a limpeza das tubagens.

O peróxido devido ao seu elevado poder oxidativo tem a capacidade de neutralizar o efeito dos AB, contudo como a concentração de peróxido utilizada está muito diluída na água, a

sua real proporção é bem mais baixa que a do AB presente para os coelhos, promovendo unicamente uma ligeira oxidação do antibiótico. O uso de peróxido interfere significativamente com os probióticos, pois sendo este um biocida haverá uma neutralização da ação do probiótico. O peróxido é efetivo na sanitização intestinal, isto é, impede a multiplicação de espécies microbianas, mesmo as comensais que se encontrem numa proporção anormal no trato digestivo do coelho.

O peróxido de hidrogénio é um desinfetante caro e que implica o uso de um dosificador (*Fotografia 13, Anexo VII*). Por outro lado, tem um poder de oxidação muito elevado, eliminando biofilmes e promovendo a “sanitização” intestinal dos coelhos, sendo assim um produto mais eficaz que o cloro e também mais seguro, na quantidade correta, em virtude de não serem conhecidos nenhuns produtos da degradação da matéria orgânica. É possível quantificar a quantidade de peróxido existente nas tubagens da água de consumo dos coelhos (*Fotografia 32, Anexo VI*), dando ao produtor uma ferramenta para o controlo da desinfecção das águas na sua produção cunícula.

É importante realçar que a diluição do peróxido de hidrogénio é de extrema importância, devido ao seu grande poder oxidante; na presença de uma sobredosagem pode levar à morte de um elevado número de animais. Os coelhos aparecem com úlceras na boca e estômago (*Fotografia 33, Anexo VII*), congestão vascular periférica (*Fotografia 34, Anexo VII*), congestão cardíaca (*Fotografia 35, Anexo VII*), congestão renal com lesões compatíveis de nefrite intersticial (*Fotografia 36, Anexo VII*), hepatomegalia e uma urina com cloração acastanhada (*Fotografia 37, Anexo VII*), revelando, após análise laboratorial, grande quantidade de uroporfirina na urina dos coelhos. Estes sinais clínicos foram observados numa das explorações monitorizadas nesta tese (Exploração B), em que houve uma sobredosagem de peróxido de hidrogénio.

8. Material e métodos (II)

8.1. Análise microbiológica água

As amostras de água das explorações vieram acondicionadas em garrafas de plástico acondicionadas em bolsas térmicas, com volumes que poderiam variar entre 1 e 2 L. A água era de imediato analisada através de um sistema de filtração por vácuo, constituído por um kitasato, pinça fixadora, suporte para a membrana filtrante, copo graduado, bomba de vácuo e membrana filtrante com poros de 0,45 µm. Antes de colocar a amostra de água no copo de filtração graduado, a amostra era agitada seis vezes.

De cada amostra de água filtraram-se 200 mL para uma placa de TBX, 100 mL para uma placa de TBX enriquecida com ampicilina, 100 mL para uma placa de TBX enriquecida com ciprofloxacina e 200 mL para uma placa de S-B. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h as placas com TBX (*Fotografia 38, Anexo VIII*) e durante 48h na placa de S-B. O meio de

cultura PCA preparado previamente (hidratado e esterilizado) era estabilizado a 48-50°C num banho-maria. Posteriormente volumes de 1 mL, 100 µL e 10 µL da amostra foram semeados por incorporação em PCA. Nas amostras em que era expectável uma baixa contaminação microbiana, filtraram-se volumes de 10 mL e 100 mL; os filtros eram incubados sobre PCA. As placas incubadas a 22°C eram contadas ao fim de 72h e as incubadas a 37°C foram contadas às 48h.

Para a confirmar a presença de *Enterococcus* spp., as membranas filtrantes foram transferidas para placas de KAA (Oxoid®) e incubadas a 44°C durante um máximo de 4h. Nesse intervalo eram contadas as colónias esculina-positivas, apresentando coloração negra (*Fotografia 39, Anexo VIII*).

9. Resultados

Na sua maioria a recolha das amostras de água foram acompanhadas por uma visita às explorações, onde se observaram as condições gerais de higiene da exploração, o sistema de recolha e tratamento de águas, bem como os locais de recolha das amostras (*Fotografias 11, 12, 14, 15 e 16 Anexo VI*). Todas as amostras foram processadas do mesmo modo, obtendo-se resultados muito diversos em relação à origem, ao estado sanitário e de produtividade da exploração, mas também em função da altura do ano que se fazia essa recolha. As explorações B e F são as únicas onde o tratamento das águas é efetuado com o peróxido de hidrogénio. As restantes explorações efetuaram o tratamento com cloro.

Os resultados das análises microbiológicas da água de consumo dos coelhos antes de efetuar o tratamento (desinfecção) das águas estão descritos no *Quadro 4*, e após o tratamento das águas no *Quadro 5, Anexo VIII*. As explorações G e F (Dez. 2011) apresentaram a maior contagem de UFC/100mL de *Enterococcus* spp. nas águas de consumo dos coelhos, atingindo um valor de 139 UFC/100mL. Na exploração F observou-se um aumento considerável das UFC/100mL de *E. coli*, *Enterococcus* e microrganismos totais em dezembro de 2011, comparativamente à análise inicial efetuada em outubro de 2011.

Verificou-se uma clara diminuição nas contagens bacterianas após a desinfecção da água de consumo dos coelhos relativamente às explorações sem tratamento de águas ($n=4$), com a exceção da exploração I, em que as UFC/100mL totais aumentaram. Na exploração M a água foi sempre tratada com cloro, o que justifica os excelentes resultados na qualidade da água de consumo dos coelhos.

Recolheram-se nas explorações amostras dos dados relativos a alguns indicadores zootécnicos, nomeadamente fertilidade, média de nascidos vivos, mortalidade no ninho e mortalidade na fase de crescimento. Estes índices de produtividade, apresentados nos *Quadro 4 e 5, Anexo VIII*, acompanharam a melhoria da qualidade das águas de consumo dos coelhos, com aumentos significativos na fertilidade em todas as explorações, bem como na média de

nascidos vivos. A mortalidade nos ninhos e na fase de crescimento acompanharam os dados da qualidade de água, excetuando nas explorações D e O, em que o seu valor aumentou ligeiramente.

Verificamos também uma relação direta entre a pluviosidade e a qualidade da água. Em todas as explorações a água de consumo dos coelhos é proveniente de poços privados, verificando-se nos meses chuvosos, como de novembro e dezembro de 2011, bem como uma primavera de 2012 ligeiramente chuvosa, um maior arrastamento de bactérias presentes no solo e consequentemente, um aumento significativo do número de *E. coli*, *Enterococcus* spp. e de microrganismos totais nas águas de consumo dos coelhos.

O aumento do índice de mortalidade do ninho e na fase de crescimento, observado em algumas explorações após o tratamento de água, é devido a uma seleção efetuada nas explorações, onde os coelhos mais pequenos e menos desenvolvidos são retirados das jaulas, e incorporam como mortalidade na fase de crescimento os coelhos rejeitados no matadouro.

10. Discussão/Conclusão Água de consumo dos Coelhos

Em todas as explorações a água de consumo dos coelhos é proveniente de poços privados, não sujeitos a qualquer controlo microbiológico, justificando as contagens elevadas dos microrganismos contaminantes.

É importante frisar que, quando um produtor se preocupa com a qualidade microbiológica da água de consumo dos coelhos, este é também pró-ativo em outros domínios, procurando sempre melhorar os índices de produtividade, presando a biossegurança, o manejo e a saúde dos animais da exploração. É, como tal, ousado afirmar que a totalidade do incremento nos índices de produção se deve exclusivamente ao controlo das águas. Mesmo conceptualmente, a desinfecção das águas não provoca qualquer incremento na produtividade. O que verdadeiramente está em causa é em minimizar os efeitos negativos que a água possa ter na saúde dos animais.

A desinfecção correta das águas de consumo dos coelhos, com cloro ou peróxido, relevou-se um importante fator na redução da contaminação fecal, e no aumento da performance produtiva das explorações. A maioria das explorações já efetuava tratamento das águas com cloro, contudo esse tratamento não era monitorizado, nem era controlado corretamente a utilização dos desinfetantes nas águas de consumo dos coelhos ou realizado a análise microbiológica periódica.

Um controlo deficiente na concentração de desinfetantes também se pode revelar fatal para os coelhos. Num caso paradigmático envolvendo uma exploração em que houve sobre-dosagem de peróxido hidrogénio, os coelhos apareceram com hemorragias várias (*Fotografia 40, Anexo VII*), congestão cardíaca e renal, e uroporfirinas na urina associados a uma perda drástica da condição física, resultando num elevado índice de mortalidade de animais adultos e

lápares na exploração. Este caso observado na exploração B em maio de 2012, resultou de uma deficiência no mecanismo de dosificação do peróxido e da consequente sobre-dosagem deste agente oxidante (*Fotografia 13, Anexo VII*).

As chuvas têm uma relação direta com a qualidade da água de consumo dos coelhos: meses mais chuvosos traduzem maior contaminação das águas no ponto de captação. O arrastamento de bactérias presentes no solo provocado pelas chuvas contaminam os poços e consequente, vão contaminar a água de consumo dos coelhos. Atendendo a que o doseamento do desinfetante é constante ao longo do ano, um aumento na carga microbiana na captação pode ultrapassar a capacidade digenésica da concentração utilizada.

O cloro como desinfetante eficaz e económico é o mais comumente usado em produção animal. O cloro é eficaz na redução dos microrganismos presente nas águas de consumo, sobretudo nos microrganismos patogénicos. Contudo o perigo tóxico que apresenta para os animais, e a dificuldade de o quantificar na água são importantes limitações ao seu uso. Em contraste o peróxido de hidrogénio revelou-se um excelente biocida, bem como muito fácil de quantificar na água tratada através do uso de tiras reativas. Não apresenta em quantidades controladas qualquer perigo para os animais, e nem deixa qualquer cheiro na água, contudo quando o doseamento não é efetuado de modo correto pode ter implicações graves.

O tratamento das águas, e o seu controlo microbiológico deve ser sempre efetuado nas explorações de produção intensiva de coelhos, bem como noutros tipos de produção animal. A qualidade da água é um fator de extrema importância na produção animal, devendo os produtores controlarem a sua qualidade. Para tal seria importante que se criassem instrumentos legais sobre a qualidade e sobre os controlos microbiológicos às águas de consumo para espécies pecuárias.

11. Observação Final

As patologias, principalmente do foro entérico, são um importante entrave na utilização de um probiótico. Importa como tal desenvolver esforços na genética, nutrição, biossegurança, manejo animal e controlo veterinário para minimizar o impacto que a intensificação produtiva possa ter na ecopatologia dos coelhos. Os probióticos serão uma ferramenta contribuindo para este objetivo, e não a solução única. Os AB têm ainda um papel importante no controlo dos estados mórbidos desencadeados por agentes infecciosos ou desequilíbrios da microbiota com o seu hospedeiro. Importa também verificar a complementaridade e compatibilidade das diferentes estratégias. Por exemplo, tratamento das águas e o uso de probióticos na água não é exequível em conjunto. Qualquer tipo de desinfetante usado no tratamento de águas de consumo tem um efeito biocida contra contaminantes existentes na água, e um efeito de “sanitização” da flora entérica dos animais interferindo com os benefícios que os probióticos possibilitam.

Com os resultados obtidos a nível de produtividade com tratamento correto das águas, revelou-se muito mais vantajoso, e com resultados mais promissores para uma produção cunícula mais segura, rentável e menos dependente de antimicrobianos.

O uso de probióticos na produção cunícula implica mais investigação, contudo é necessário primeiro assegurar explorações com um correto controlo sanitário e produtores pró-ativos em matéria de biossegurança.

Bibliografia

- Abt M.C., Artis D. (2009) "The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis" **Current Opinion in Gastroenterology** nº25, 496-502.
- Amber K.H., Yakout H.M., Hamed Rawya S. (2004) "Effect of feeding diets containing yucca extract or probiotic on growth, digestibility, nitrogen balance and caecal microbial activity of growing New Zealand white rabbits" In Proc. **8th World Rabbit Congress**, Puebla, México, 737-741.
- Andoh A., Fujiyama Y. (2006) "Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease" **World Journal of Gastroenterology** nº12, 4452-4460.
- Ayling G.W., Castrantas H.M. (1981) "Waste treatment with hydrogen peroxide" **Chemical Engineering** nº24, 79.
- Barral E., Biet F., Duivon D., Filleul J.F., Prim R. (2000) "Assessment of the extent of lesions, parasites and bacteria in rabbit farms contaminated by epizootic rabbit enterocolitis" Proc. **7th World Rabbit Congr.**, Valencia, Spain, 199-205.
- Bazzoli N. (1993) "O Uso da Desinfecção no Combate à Cólera" **Fundação Nacional de Saúde** – Coordenação Regional de Minas Gerais. Recife.
- Bedford M.R. (2000) "Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits" **Anim. Feed Sci. Techn.** nº86, 1-13.
- Benyacoub J. (2007) "Probiotics as tools to improve health: Perspective for pets" A Supplement to Compendium: **Continuing Education for Veterinarians** nº 29, 11-19.
- Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (2005) "Genus Escherichia" In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 2nd ed., NY, USA, 607-623.
- Camps J. (1995) "Le lapin est d'origine ibérique" **Cuniculture** nº22, 118-120.
- Casewell M., Friis C., Marco E., McMullin P., Phillips I. (2003) "The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for humans and animals health" **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** nº52, 159–161.
- Choct M. (2006) "Enzymes for the feed industry: past, present and future" **World's Poultry Sci. J.** nº62, 5-15.
- Choct M. (2009) "Managing gut health through nutrition" **British Poultry Science** nº50, 9-15
- Colin M., Lebas F. (1996) "Rabbit meat production in the world. A proposal for every country" in Proc. **6th World Rabbit Cong.**, Toulouse, France, 323-330.
- Coudert P., Lebas F., Licois D., (1997) "Une nouvelle pathologie ravage les élevages. La profession se mobilise" **Cuniculture** nº24, 225-229.
- Coudert P., Licois D., Zonnekeyn V. (2000) "Epizootic Rabbit Enterocolitis and coccidiosis: a criminal conspiracy" Proc. **7th World Rabbit Congr.**, Valencia, Spain, 215-218.

- Cruz R. M. (2000) “*Reativo de Fenton e Foto-Fenton em Efluente de Alta Salinidade*” **Tese de M. Sc.**, Rio de Janeiro, Brasil.
- Dewrée R., Meulemans L., Lassence C., Desmecht D., Ducatelle R., Mast J., Licois D., Vindevogel H., Marlier D. (2003) “Experimentally Induced Epizootic Rabbit Enteropathy: clinical, histopathological, ultrastructural, bacteriological and haematological findings” **World Rabbit Sci.** nº15, 91-102.
- Dibner J.J., Richards J.D. (2005) “Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action” **Poult. Sci.** nº 84, 634-643.
- Duperray J., Eckenfelder B. Puybasset A., Richard A., Rouault M., (2000) “Interest of zinc bacitracin in the treatment and the prevention of the epizootic rabbit enterocolitis syndrome in growing rabbit” **Proc. 7th World Rabbit Congress** nº8, Valencia, Spain, 233-240.
- Duperray J. (2003) “Une stratégie de recherche tournée vers la maîtrise sanitaire” **L’Eleveur de lapins** nº93, 34.
- Duval M.L. (1998) “Développement de l’entérocólite en France” In **Proc. 7^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole**, Séance d’actualité: L’entérocólite épizootique, Lyon, France, 1-8.
- EC (2001) “Commission of the European Communities, Commission Recommendation, 2001/459/EC” **Official Journal of European Union** nº 161, 42–44.
- EC (2003) “Commission of the European Communities, Commission Regulation No. 1831/2003” **Official Journal of European Union** nº268, 29–43
- Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J. (2000) “*Escherichia coli*: The Best Biological Drinking Water Indicator for Public Health Protection” **J. Appl. Microbiol.** nº88, 106-116.
- Eshborn (1985) “A compendium of rabbit production appropriate for conditions in developing countries” **Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ) BmbH**, Federal Republic of Germany, 9-12.
- Falcão-e-Cunha L., Castro-Solla L., Maertens L., Marounek M., Pinheiro V., Freire J., Mourão J.L. (2007) “Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review” **World Rabbit Sci.** nº15, 127-140.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) (2002) “working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food” and “guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint working group report on drafting” London, Canada, 1-11.
- Fenner F. (1994) “Myxoma vírus” In **Virus infections of Vertebrates** nº5, A.D.M.E. Osterhaus (Ed.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 59-71.
- Ferreira W.F.C, Sousa J.C.F., Lima N. (2010) “Microbiologia” **Lidel-Edições técnicas Lda**,

- Lisboa, 506-522.
- Finzi A., Valentini A., Filippi G. (1992) "Alimentary, excretory and motorial behaviour in rabbit at different ambient temperatures" **Journal Applied Rabbit Research** nº15, 732-738.
- Fonseca A., Falcão L., Kocher A., Spring P. (2004) "Effect of dietary mannan oligosaccharides in comparison to oxytetracyclin on performance of growing rabbits" Proc. **8th World Rabbit Congress**, Pueblá, Mexico, 829-833.
- Frank D.N., St Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R. (2007) "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel disease" **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** nº104, 13780-13785
- Frymus T., Bielecki W., Jakubowski T. (1991) "Toxigenic *Pasteurella multocida* in rabbits with naturally occurring atrophic rhinitis" Zentralbl Veterinarmed B. nº38, 265-268.
- Fujioka R., Sian-Denton C., Borja M., Castro J., Morpew K. (1999) "Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Guam's streams" **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement** nº85, 83-89.
- Gill H.S. (2003) "Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract" **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology** nº17, 755-773.
- Gippert T., Virag, G., Nagy I. (1992) "Lacto-Sacc in rabbit nutrition" **J. Appl. Rabbit Res.** nº15, 1101-1104.
- Guillot J.F. (2001) "Consequences of probiotics release in the intestine of animal" in **J. Brufeu (Ed.) Feed Manufacturing in the Mediterranean Region Improving Safety: from feed to food**, Zaragoza, 17-21.
- Hollister A.G., Cheeke P.R., Robinson K.L., Patton N.M. (1990) "Effects of dietary probiotics and acidifiers on performance of weanling rabbits" **J. Appl. Rabbit Res.** nº13, 6-9.
- Hooper L.V., Midtvedt T., Gordon J.I. (2002) "How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine" **Annual Review of Nutrition** nº22, 283-307.
- IACA (Associação Portuguesa dos Industriais dos Alimentos Compostos para Animais) (2012) "Produção dos alimentos compostos para animais em 2011" em www.iaca.pt.
- INE (2008) "Estatísticas Agrícolas 2007" **Instituto Nacional de Estatística**, Lisboa, Portugal, 1-115.
- IRAR (2007) "Desinfecção da Água destinada ao consumo humano" **Recomendação IRAR** nº05.
- Jobert J.L., Eono F., Le Gall-Recule G., Guittet M. (2001) "Reproduction expérimentale de l'Entérocólite Épizootique du Lapin : étude anatomo-clinique et hématologique" **9^{èmes Journ. Rech. Cunicole}**, (IT A VI Ed.) Paris, 135-138.
- Lebas F., Matherom G. (1982) "Livestock Production Perspectives and prospects VIII Rabbits" **Livestock production science** nº9, 235-25.

- Lebas F., Coudert P., Rouvier R., Rochambeau H. (1986) "Reproduction and environment, I The rabbit husbandry, health and production" Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, **Animal Production and Health Series** n° 21, 60-62.
- Lebas F., Coudert P., Licois D. (1997), "Une nouvelle pathologie ravage les élevages : la profession se mobilise", **Cuniculture** n°24, 225-229.
- Lebas F., Gidenne T., Perez J.M., Licois D., (1998) "Nutrition and **pathology**" In **De Blas C., Wiseman J. (Eds.) The Nutrition of the Rabbit**, CAB Publishing, 197–214.
- Lebas F., Colin M. (2000) "Production et consommation de viande de lapin dans le monde estimation en l'an 2000" **I Jornadas Internacionais de Cunicultura**, Vila Real, Portugal, 3-12.
- Licois D. (1998) "Bilan des travaux réalisés à l'INRA sur l'entérococolite épizootique, dans l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie" In Proc. **7^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole** Séance d'actualité: L'entérococolite épizootique, Lyon, France, 20-25.
- Licois D., Vautherot J.F., Coudert P., Dambrine G. (1998) "Modèle de reproduction expérimentale de l'entérococolite épizootique chez des lapins EOPS" **World Rabbit Sci.** n°6, 349-353.
- Licois D., Coudert P., Ceré N., Vautherot J.F. (2000) "Epizootic Enterocolitis of the rabbit: a review of current research" Proc. **7th World Rabbit Congr.** N°8, Valencia, Spain, 187-194.
- Licois D. (2004) "Domestic rabbit enteropathies" In Proc **8th World Rabbit Congr.**, Puebla, Mexico, 385-403.
- Licois D., Coudert P. (2005) "Entéropathie épizootique du lapin. Pouvoir infectieux de l'inoculum TEC4: effet dose et maintien de la virulence en fonction du temps" In Proc. **11^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole**, Paris, France, 265-268.
- Licois D., Wyers M., Coudert P. (2005) "Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization" **Veterinary Research** n°36, 601-613.
- Luick B.R., El-Sayaad A.E., Cheeke P.R. (1992) "Effect of fructooligosaccharides and yeast culture on growth performance of rabbits" **J. Appl. Rabbit Res.** n°15, 1121-1128.
- Maertens L., Van Renterghem R., De Groote G. (1994) "Effects of dietary inclusion of Paciflor® (Bacillus CIP 5832) on the milk composition and performances of does and on caecal and growth parameters of their weanlings" **World Rabbit Sci.** n°2, 67-73.
- Maertens L., Cornez B., Vereecken M., Oye S.V. (2005) "Efficacy study of soluble bacitracin (Bacivet S(R)) in a chronically infected Epizootic Rabbit Enteropathy environment" **World Rabbit Sci.** n°13, 165-178.
- Marlier D., Dewrée R., Lassence C., Licois D., Mainil J., Coudert P., Meulemans L., Ducatelle R., Vindevogel H. (2005) "Infectious agents associated with epizootic rabbit

- enteropathy: isolation and attempts to reproduce the syndrome" **Veterinary Journal** nº172, 493-500.
- Marounek M., Vovk S., Skrivanová V. (1995) "Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits" **Br. J. Nutr.** nº73, 463-469.
- Mateo A.C. (2004), "Passado, presente y futuro de la cunicultura" **Revista Boletín de Cunicultura** Jan-Fev 2004 nº 131, 6-11.
- Mathur S., Singh R. (2005) "Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - review" **International Journal of Food Microbiology** nº10, 281-295
- Mazmanian S.K., Round J.L., Kasper D. (2008) "A microbial symbiosis factor prevents inflammatory disease" **Nature** nº453, 620-625.
- Michelan A.C., Scapinello C., Natali M.R.M., Furlan A.C., Sakaguti E.S., Faria H.G., Santolin M.L.R., Hernandez A.B. (2002) "Utilização de probiótico, ácido orgânico e antibiótico em dietas para coelhos em crescimento: ensaio de digestibilidade, avaliação da morfometria intestinal e desempenho" **Rev. Bras. Zootec.** nº31, 2227-2237.
- Michelland R.J., Combes S., Monteils V., Cauquil L., Gidenne T., Fortun-Lamothe L. (2009) "Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit" **J. Anaerobe** May 2009.
- Mourão J.L.M. (2003) "Produção de Leporídeos: O coelho em zootecnia" **Série Didática** nº 217, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 62-63.
- Mourão J.L.M., Pinheiro V.M.C. (2004) "Produção de carne em cunicultura" **Série Didática** nº 257, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 103.
- Neyens E., Baeyens J. (2003) "A review of classic Fenton's peroxidations as an advanced oxidation technique" **Journal of Hazardous Materials** nº98, 33-50.
- O'Hara A.M., Shanahan F. (2007) "Gut microbiota: mining for therapeutic potential" **Clinical Gastroenterology and Hepatology** nº5, 274-284.
- Okerman L., Devriese L.A., Maertens L., Okerman F., Godard C. (1984) "Cutaneous staphylococcosis in rabbits" **Vet. Rec.** nº114, 313-315.
- Partanen K.H., Mroz Z. (1999) "Organic acids for performance enhancement in pig diets" **Nutr. Res. Rev.** nº12, 117-145.
- Peeters J., Maertens L., Geeroms R. (1992) "Influence of galacto-oligosaccharides on zootechnical performance, cecal biochemistry and experimental colibacillosis O103/8+ in weaning rabbits" **J. Appl. Rabbit Res.** nº 15, 1129-1136.
- Percy D.H., Barthold S.W. (2001) **Pathology of Laboratory Rodents & Rabbits** 2º Edition, Blackwell publishing, 265-284.
- Pereira S. (2000) "Organização da Produção em Portugal" **Livro de Comunicações das I Jornadas Internacionais de Cunicultura**, 5-45.
- Rebollar P.G. (2007) "Parâmetros reprodutivos indicadores de produtividade em granjas

- comerciales de conejo de carne” **Revista Boletín de Cunicultura** nº149, Jan-Fev 2007, 44-53.
- Rossel J.M., Badiola J.I., de La Fuente L.F., Carmenes P. (1992) “Rhinitis of the domestic rabbit. An epidemiological survey during the period 1986-1991” **J. Applied Rabbit Res.** nº15, 1382-1388.
- Rossi G., Stanzel C., Witte W. (1995) “*Staphylococcus aureus* infections in the rabbit and the transmission of the pathogens with the sperma” Proc. **Arbeitstagung über Haltung und Krankheiten der Kaninchen** nº9, Pelztier und Heimtiere, Celle, 251-257.
- Rossi G., Vandekerckhove D., Köhler B., Hafez H.M. (1999) “The appearance of enterocolitis with high mortality in middle Germany” **Abstracts of 11th Symposium of Celle on Housing and Diseases of Rabbits, Furbearing and Pet Animals World Rabbit Science** nº7, 123.
- Ruiz J., Camps J., Tudela F., Garreau H. (2001) “Incidência del añadido de um reposta patas sobre la produccion de las conejas” **I Symposium Iberico de Cunicultura**, Aveiro, Portugal, 168-173.
- Salminen S., Isolauri E., Salminen E. (1996) “Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges” **Antonie van Leeuwenhoek** nº70, 347-358.
- Salzman N.H., Ghosh D., Huttner K.M., Paterson Y., Bevins C.L. (2003) “Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin” **Nature** nº422, 522-526.
- Salyers A.A., Gupta A., Wang Y. (2004) “Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes” **Trends in Microbiology** nº 12, 412-416.
- Sandford J.C. (1987) “Manual do Criador de Coelhos” **Editorial Presença**, Lisboa, 215.
- Scapinello C., Garcia de Faria H., Furlan A.C., Michelin A.C. (2001) “Efeito da utilização de oligossacarídeo manose e acidificantes sobre o desempenho de coelhos em crescimento” **Rev. Bras. Zootec.** nº30, 1272-1277.
- Siggers R.H., Thymann T., Siggers J.L., Schmidt M., Hansen A.K., Sangilda P.T. (2007) “Bacterial colonization affects early organ and gastrointestinal growth in the neonate” **Livestock Science** nº109, 14-18.
- Silva A. (2002) “Controle Ambiental em Cunicultura Industrial” **II Jornadas Internacionais de Cunicultura**, Vila Real, Portugal, 103-110.
- Simon O., Vahjen W., Scharek L. (2003) “Micro-organisms as feed additives-Probiotics” **Proceedings of 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs**, Banff, Canada, 295-315.
- Souza A.L.P., Kawano M., Martins M.L., Handa R.M. (2008) “Toxicologia dos Trihalometanos formados em Águas de Abastecimento” **VI Semana de Estudos da Engenharia**

Ambiental, Campus Irati.

- Szili M., Köhalmi I. (1980) "Endemic *Trichophyton mentagrophytes* infection of rabbit origin", **Mykosen** nº24, 412-20.
- Torres-Rodriguez J.M., Dronda M.A., Rossell J., Madrenys N. (1992) "Incidence of dermatophytoses in rabbit farms in Catalonia, Spain, and its repercussion on human health" **Euro Journal Epidemiology** nº8, 326-329.
- Tuohy K.M., Rouzaud G.C.M., Bruck W.M., Gibson G.R. (2005) "Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy" **Current Pharmaceutical Design** nº11, 75-90.
- Urdiales R.G. (2005) "Fisiología reproductiva de la coneja e inducción de la receptividad" III **Jornadas Internacionais de Cunicultura**, Vila Real, Portugal, 75-90.
- Van Rooij P., Detandt M., Nolard N. (2006) "*Trichophyton mentagrophytes* of rabbit origin causing family incidence of kerion: an environmental study" **Mycoses** nº49, 426-430.
- Verstegen M.W.A., Williams B.A. (2002) "Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals" **Animal Biotechnology** nº13, 113-127.
- Viana F.C. (1978) "Apontamentos de saneamento. 4. ed. Belo Horizonte" **Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva**, Escola de Veterinária da UFMG.
- Waite W. M. (1985) "A critical appraisal of the coliform test" **Journal of the Institution of Water Engineers and Scientists** nº39, 341-357.
- WHO (World Health Organization) (2008) "**Guidelines for Drinking-water Quality**" Incorporating 1st and 2nd Addenda, Volume 1, Recommendations, 3rd ed., Geneva, Switzerland.
- Williams B.A., Verstegen M.W.A., Tamminga S. (2001) "Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health" **Nutrition Research Reviews** nº14, 207-227
- Xiccato G., Trocino A. (2007), "Italy, a system of integrated rabbit production" **Livro de Comunicações do II Congresso Ibérico de Cunicultura**, 175-184.
- Yamani K.A., Ibrahim H., Rashwan A.A., El-Gendy K.M. (1992) "Effects of a pelleted diet supplemented with probiotic (Lacto- Sacc) and water supplemented with a combination of probiotic and acidifier (Acid-Pak 4Way) on digestibility, growth carcass and physiological aspects of weanling New Zealand White rabbits" **J. Appl. Rabbit Res.** nº15, 1087-1100.

Anexo I

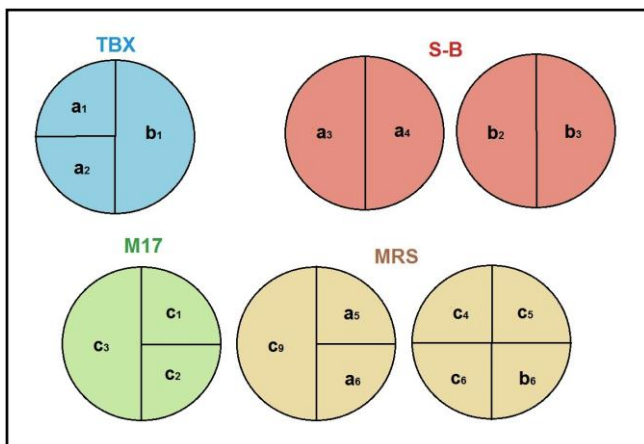


Figura 1: Meios de cultura empregues no isolamento das estirpes do probiótico.

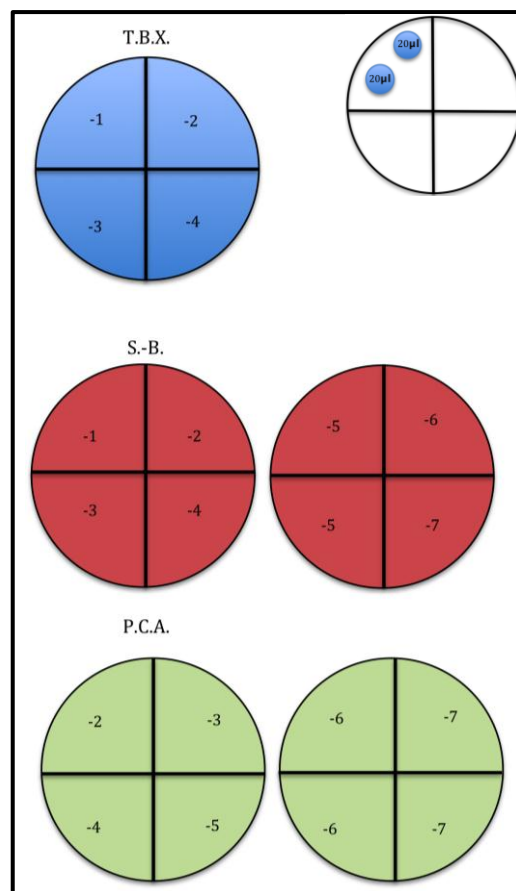
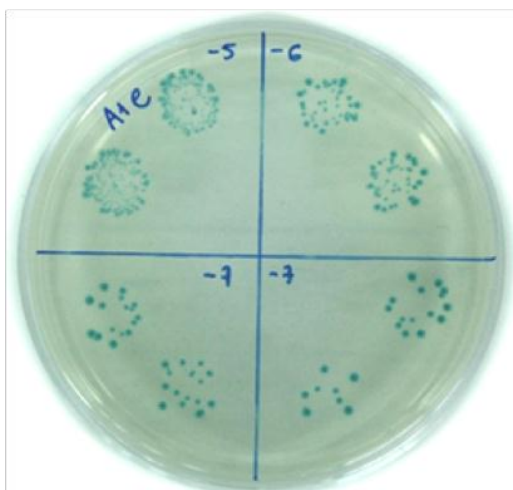
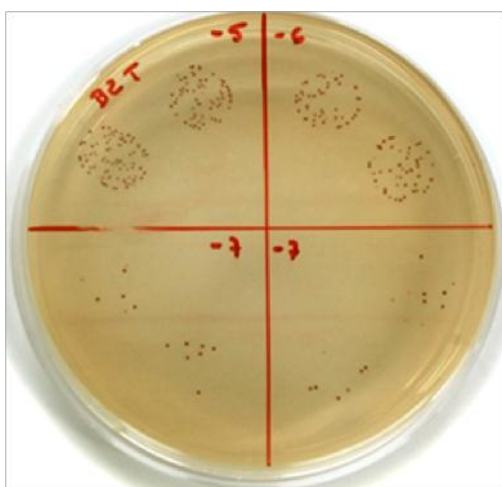


Figura 2: Esquema da "Técnica da Gota" utilizado na análise microbiológica das Fezes e Cecos dos Coelhos.



Fotografia 26: Colônias de *Escherichia coli* isoladas em meio TBX através da técnica da gota em diferentes diluições.



Fotografia 27: Colônias *Enterococcus* spp. isoladas em meio S-B através da técnica da gota em diferentes diluições.

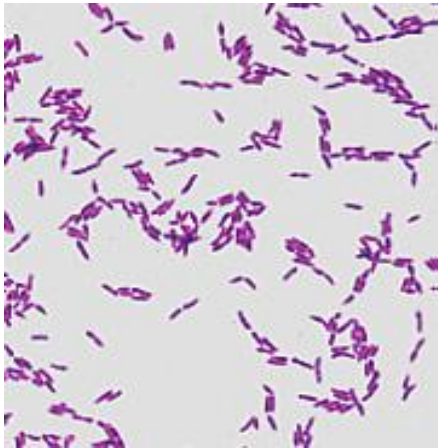


Fotografia 28: Colônias de bactérias isoladas em meio PCA através da técnica da gota em diferentes diluições.

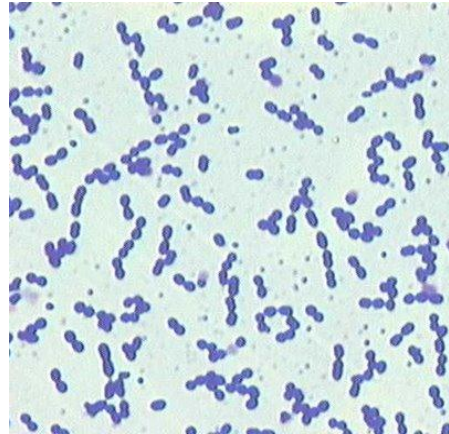
Anexo II



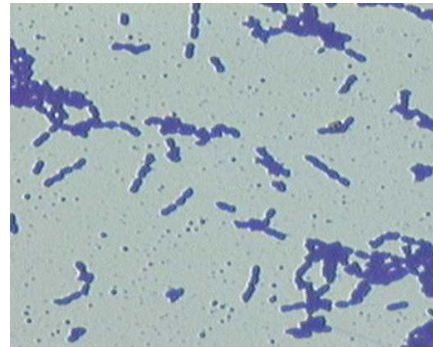
Fotografia 21: Gram de *E. coli* - Bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, comumente encontrada no intestino grosso de seres vivos de sangue quente. A maioria das estirpes de *E. coli* são inofensivas, mas alguns estirpes podem levar a patologias, principalmente a nível intestinal, nos humanos e animais. As estirpes inofensivas fazem parte da flora comensal do intestino, e beneficiam os hospedeiros produzindo vitamina K2 (Bentley *et al.*, 1982), e impedindo o estabelecimento de bactérias patogênicas no intestino (Reid *et al.*, 2001).



Fotografia 24: Gram *Lactobacillus* - Bactéria isolada em meio M17, Gram-positiva, anaeróbio facultativa, em forma de bastonete. São uma parte importante do grupo das bactérias ácido lácticas, com capacidade de converter lactose e outros açúcares em ácido láctico. Algumas espécies são utilizadas para a produção de queijo, iogurte, cerveja (*L. casei* e *L. Brevis*), vinho, cidra, cacau, e outros alimentos fermentados, bem como alimentos para animais, tais como a silagem. Foi recentemente demonstrado que algumas estirpes de *Lactobacillus spp.*, juntamente com outras bactérias lácticas, possuem potenciais propriedades terapêuticas, incluindo anti-inflamatórias e anticancerígenas (Chen *et al.*, 2009).



Fotografia 22: Gram *Enterococcus* - É um gênero de bactérias lácticas, cocos Gram-positivos que ocorrem frequentemente em pares ou cadeias curtas, comensais do aparelho digestivo e urinário dos animais. Duas espécies são comensais nos intestinos de humanos e animais, *E. faecalis* e *E. faecium*.



Fotografia 25: Gram *Leuconostoc* - Bactéria isolada em meio M17, Gram-positiva, pertencente à família de *Leuconostocaceae*. Geralmente dispostas em cadeias de cocos ovais. São intrinsecamente resistentes à Vancomicina e Catalase-negativa (que os distingue dos estafilococos). Todas as espécies deste gênero são heterofermentativas e são capazes de produzir dextrano a partir da sacarose.



Fotografia 23: Gram *Streptococcus* - bactéria isolada em MRS, Gram-positiva, esférica, pertencente ao grupo das bactérias ácido lácticas, que se agrupam em cadeias ou pares, gerando aglomerados de células como uma uva. A maioria dos estreptococos são oxidase e catalase-negativos, e muitos são anaeróbios facultativos.

Anexo III

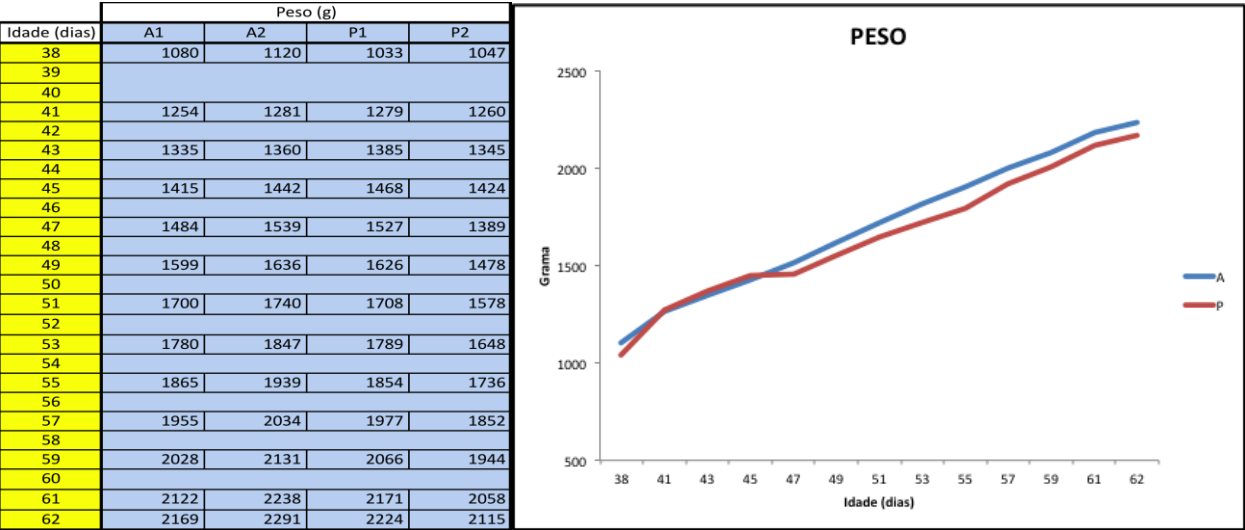


Figura 3: Evolução do peso médio nos grupos em estudo: Grupo Probiótico (P1 e P2), Grupo Antibiótico (A1 e A2).

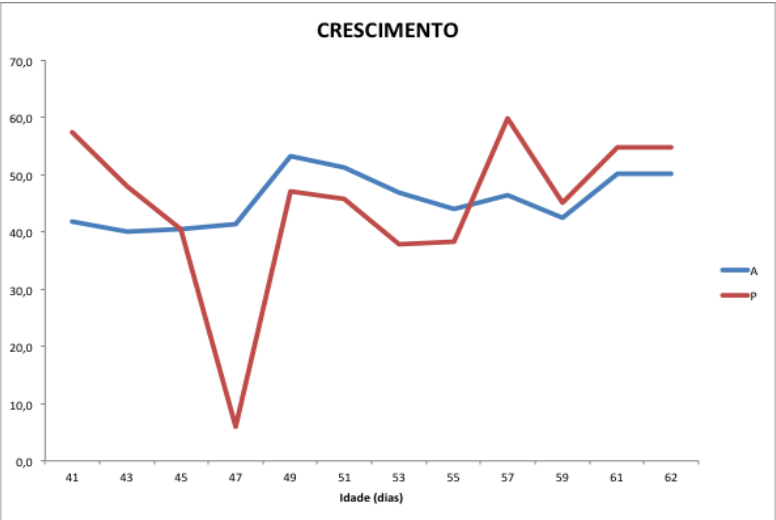


Gráfico 1: Crescimento médio apresentado nos grupos em estudo: Grupo Probiótico (P1 e P2), Grupo Antibiótico (A1 e A2).

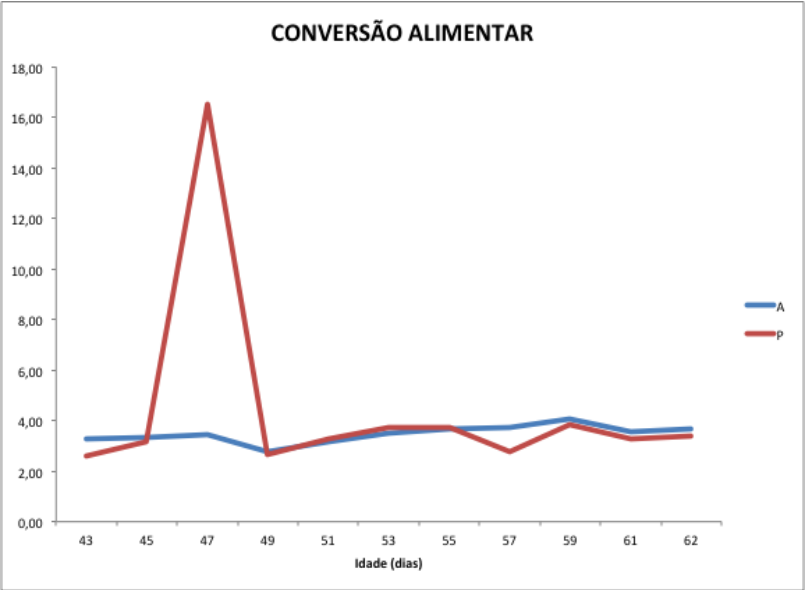


Gráfico 2: Índice de conversão alimentar apresentada nos grupos em estudo: Grupo Probiótico (P1 e P2), Grupo Antibiótico (A1 e A2).

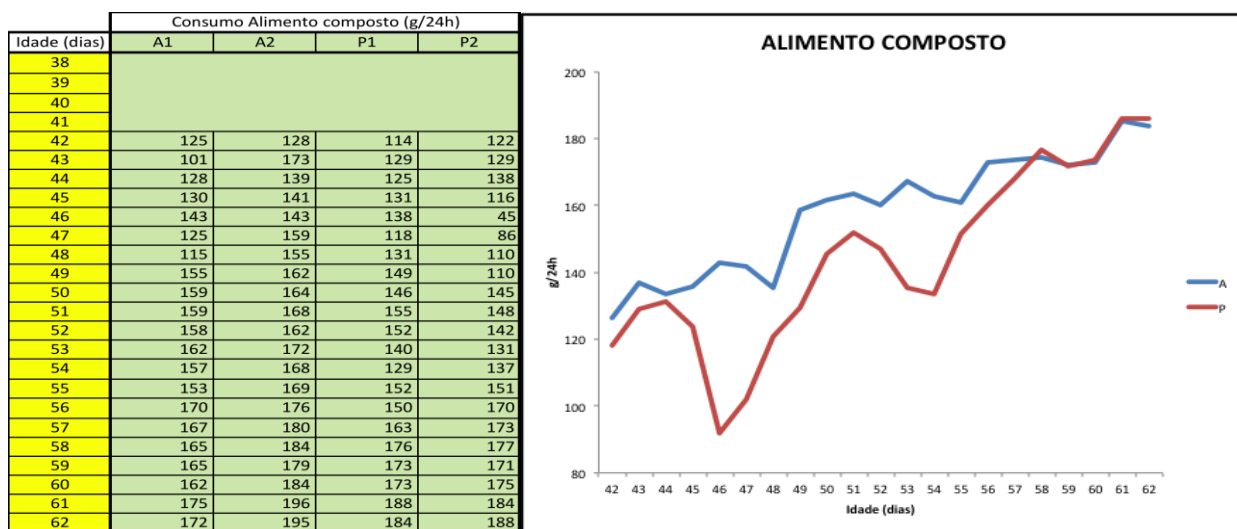


Figura 4: Evolução do consumo de alimento composto nos grupos em estudo: Grupo Probiótico (P1 e P2), Grupo Antibiótico (A1 e A2).

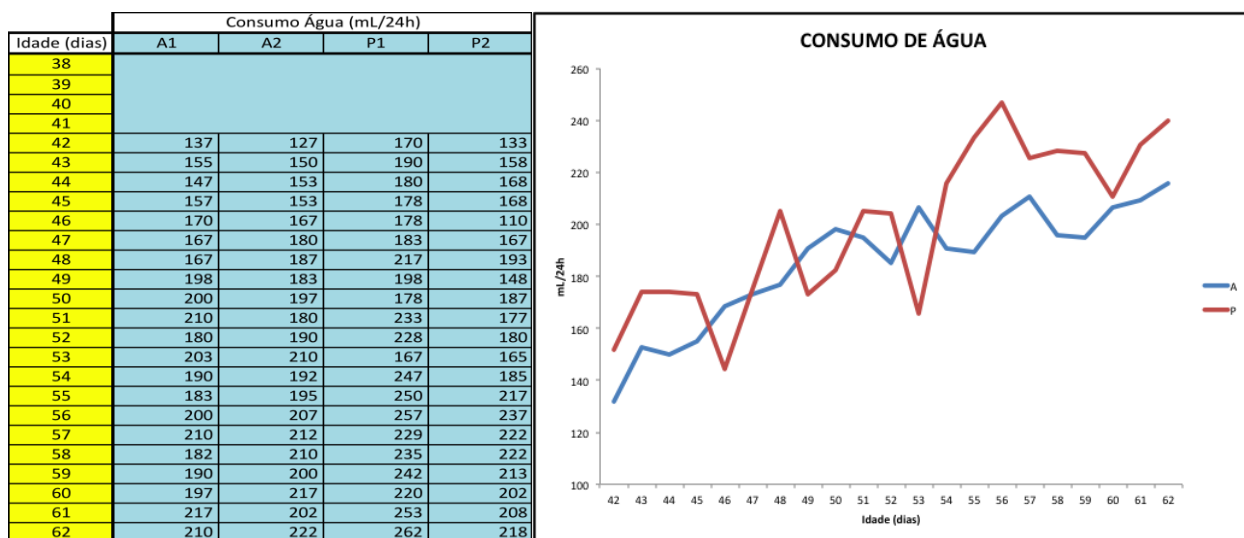


Figura 5: Evolução do consumo de água nos grupos em estudo: Grupo Probiótico (P1 e P2), Grupo Antibiótico (A1 e A2).

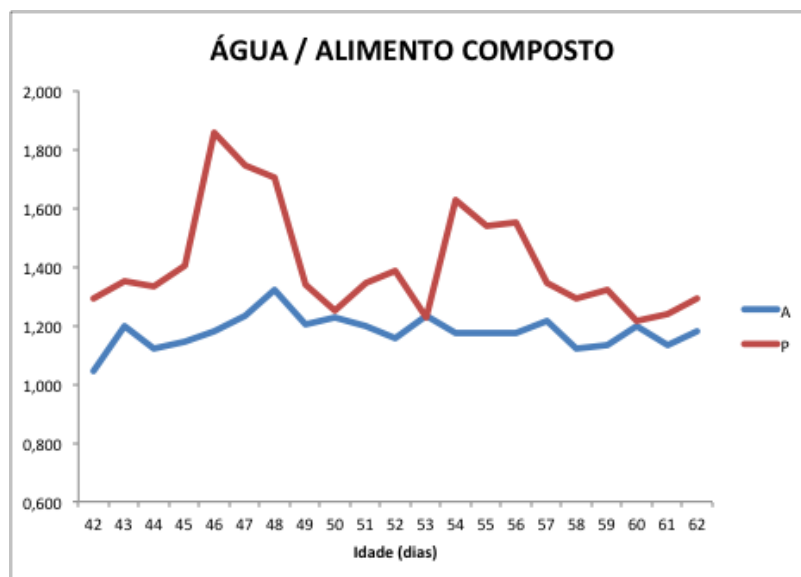


Gráfico 3: Evolução do consumo médio de água / consumo médio de ração nos grupos em estudo: Grupo Probiótico (P1 e P2), Grupo Antibiótico (A1 e A2).

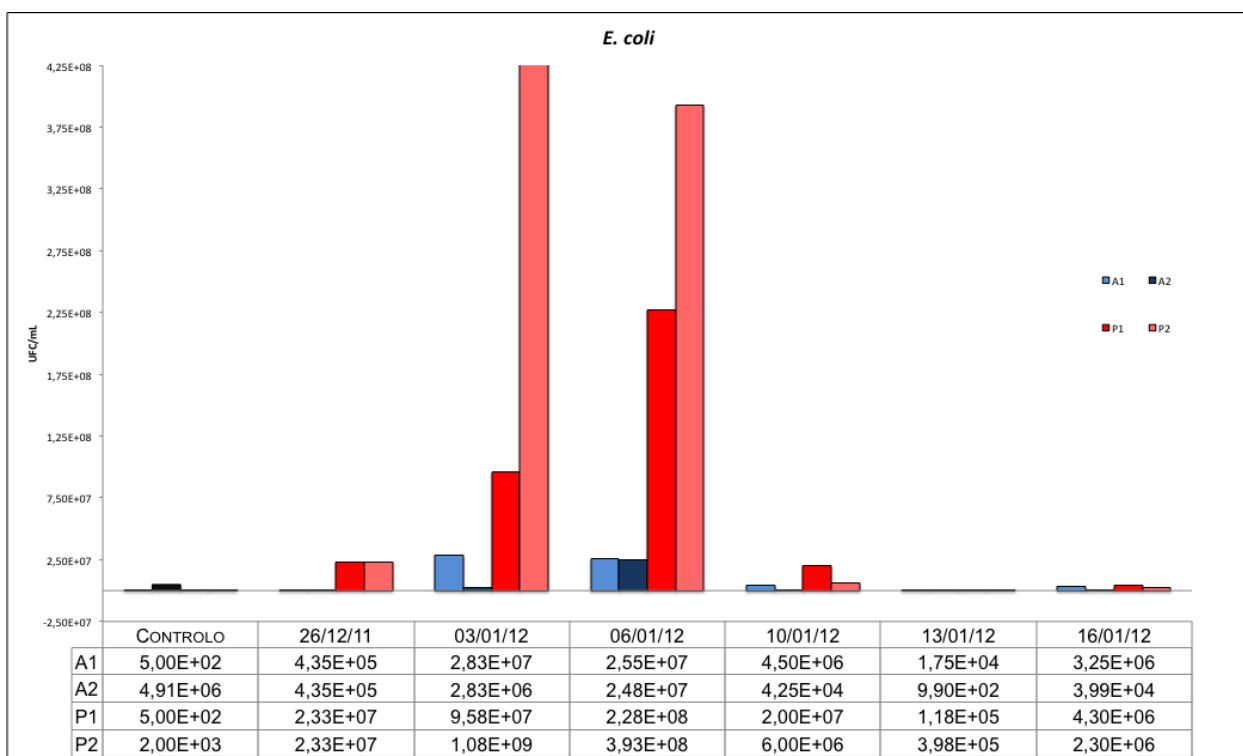


Gráfico 5: Contagens das UFC/mL de *E. coli* presente nas fezes dos coelhos dos grupos em estudo: A1, A2, P1 e P2.

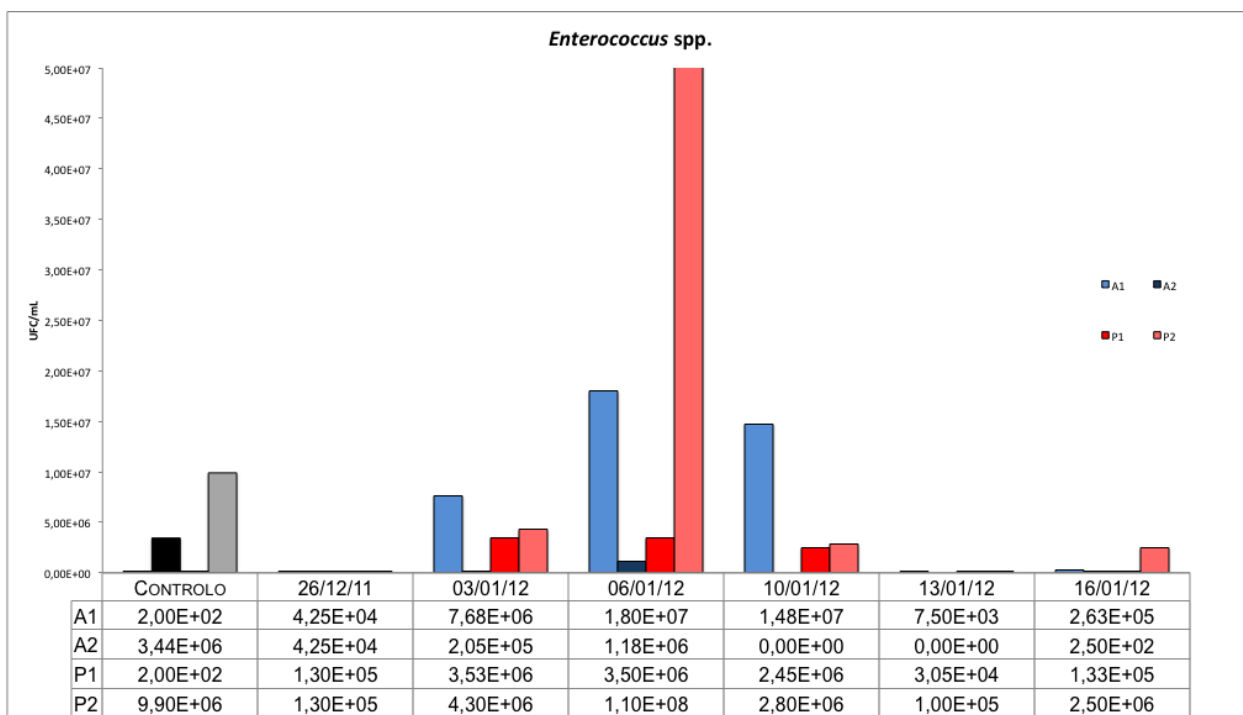


Gráfico 6: Contagem das UFC/mL de *Enterococcus spp.* presente nas fezes dos coelhos dos grupos em estudo: A1, A2, P1 e P2.

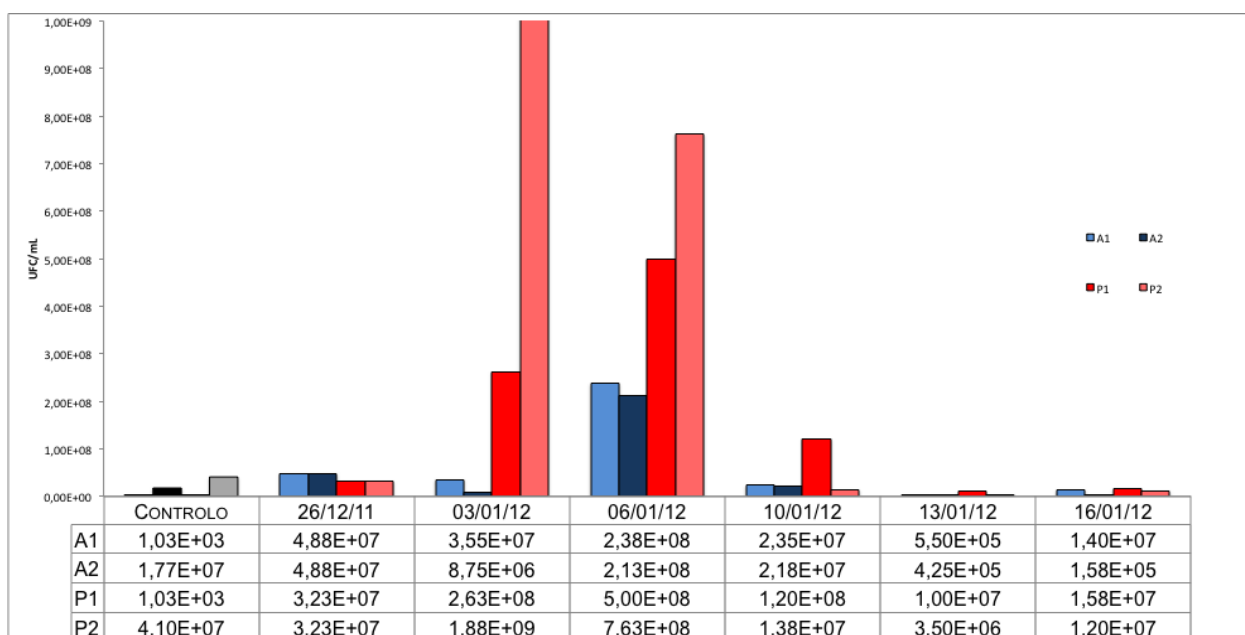


Gráfico 4: Contagem dos Microrganismos Totais presentes nas fezes dos coelhos dos grupos em estudo: A1, A2, P1 e P2.

<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterococcus spp.</i>	
Estirpe	Perfil de resistência	Estirpe	Perfil de resistência
a1	AMP; CIP; TE; NA; SXT	a3	TE; E; AZM
a2	AMP; CIP; TE; NA; TOB; SXT	a4	QD; TE; E; AZM; C; CIP
b1	TE	b2	TE
		b3	-
MRS		M17	
Estirpe	Perfil de resistência	Estirpe	Perfil de resistência
c1	SXT; DA; AZM; F; K; E	a5	TE
c2	DA; OX; AZM; F; E	a6	TE; E; AZM; CIP
c3	-	b6	TE
c4	AZM; E	c9	E; AZM
c5	DA; AZM; E		
c6	DA; F; E		

Quadro 3: Fenótipos de resistência das estirpes e das espécies utilizadas no preparado probiótico.

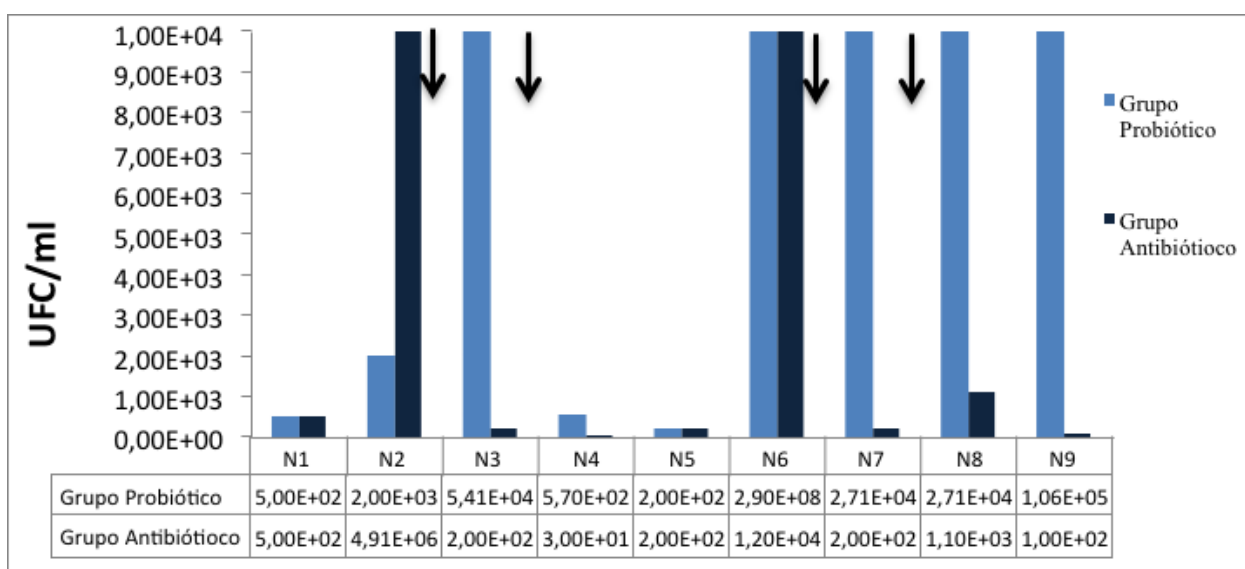


Gráfico 7: Comparação entre o número de *Escherichia coli* no grupo com antibiótico e no grupo probiótico, num estudo efetuado no campo. As setas indicam o momento da aplicação do probiótico.

Anexo IV



Fotografia 5: Cecos de coelhos com suspeita de EE.



Fotografia 6: Trato digestivo de coelho com suspeita de EE.



Fotografia 29: Jaula dos coelhos do grupo P2, com indícios de diarreia na superfície da jaula.



Fotografia 17: Coelhos do grupo probiótico no dia de chegada ao biotério.



Fotografia 20: Conjunto de jaulas do Biotério do grupo Antibiótico (A1 e A2).



Fotografia 18: Jaula dos coelhos do grupo Antibiótico (A1).



Fotografia 19: Jaula dos coelhos do grupo Probiótico (P1).

Anexo V



Fotografia 1: Pulmão de coelho com aspeto típico de Pasteurelose (*Pasteurella multocida*).



Fotografia 2: Coelho afetado com descarga nasal purulenta, suspeita de Pasteurelose.



Fotografia 4: Coelho com Tinha provocada por fungos do género *Tricophyton* ou *Microsporum*.



Fotografia 3: Tapetes de plástico utilizados na prevenção da Necrobacilose plantar, ou "Mal de Patas".



Fotografia 9: Pavilhão de produção cunícula fechado, com controlo do ambiente de produção.



Fotografia 10: Coelhas em jaula com "pousa patas" e bebedouros de taça.



Fotografia 8: Pavilhão de produção cunícula do tipo "semi ar livre", sem ventilação assistida e sem controlo do ambiente de produção.

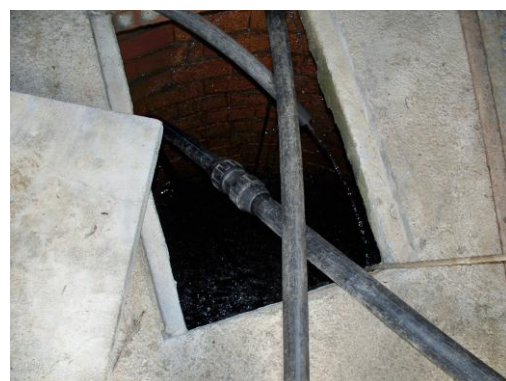


Fotografia 7: Pavilhão de produção cunícula, com acumulação de pêlo nas jaulas.

Anexo VI



Fotografia 16: Poço no exterior de uma exploração cunícula.



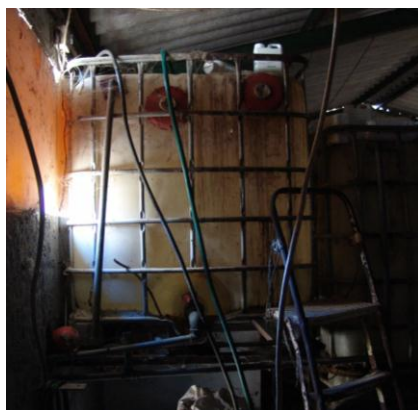
Fotografia 15: Interior do poço privado que fornece água à produção cunícula.



Fotografia 11: Reservatórios de água exteriores.



Fotografia 12: Reservatórios de água exteriores.



Fotografia 14: Reservatório de água no interior da exploração.



Fotografia 30: Cesto artesanal com pastilha de cloro no interior. Colocado no interior dos reservatórios de água.



Fotografia 32: Tiras reativas para mensuração de Peroxido de Hidrogénio. Quantificação da sua concentração nas linhas de consumo dos coelhos.



Fotografia 31: Pastilhas de cloro.

Anexo VII



Fotografia 40: Extensa hemorragia interna, com congestão cardíaca evidente.



Fotografia 35: Coração congestionado.



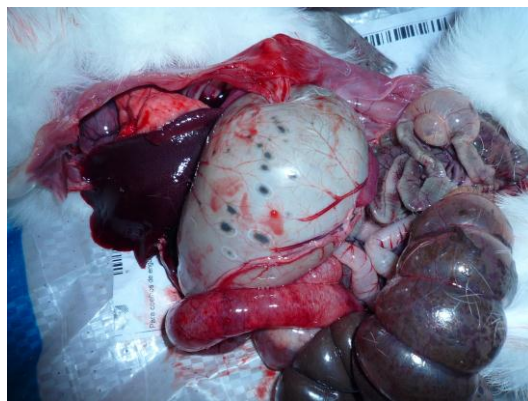
Fotografia 37: Amostra de urina normal (esquerda) e amostra com elevada quantidade de uroporfirinas (direita).



Fotografia 34: Congestão vascular periférica.



Fotografia 36: Rim congestionado.



Fotografia 33: Presença de úlceras na parede do estômago.



Fotografia 13: Depósito para a preparação de medicação, a administrar pela água de consumo; associado a um dosificador de Peroxido de Hidrogénio.

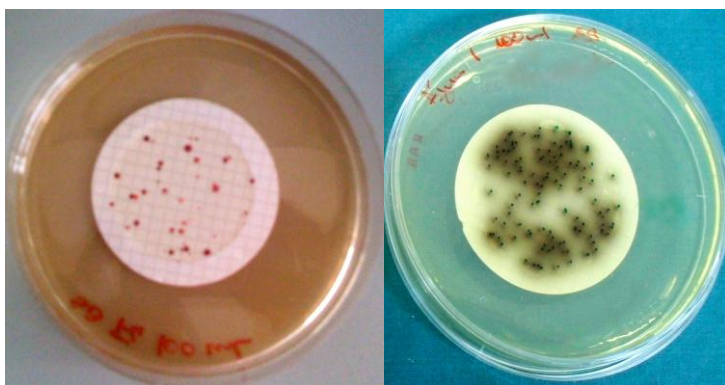
Anexo VIII

exploração	Águas de Consumo sem tratamento				Dados de Produtividade sem tratamento			
	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i>	M.T /100mL		Fertilidade	Média de Nascidos Vivos	Mortalidade Ninho	Mortalidade Engorda
	UFC/100mL	UFC/100mL	22°C	37°C				
Exploração A (Out.2011)	0	0,5	753960	5040	87%	8,8	11,8%	6,2%
Exploração B (Out.2011)	0	0	80	30	90%	9,8	6,2%	2,6%
Exploração C (Out.2011)	0	0	0/10mL	0				
Exploração D (Out.2011)	0	3	6283000	2832500	60%	-	-	30%
Exploração E (Out.2011)	1	3	721000	34000	75%	10	20%	10%
Exploração F (Out.2011)	2	2	139000	18000				
Exploração G (Out.2011)	0,5	139	850000	250000				
Exploração H (Nov.2011)	0	0	61050	130				
Exploração I (Nov.2011)	0	0	30	18				
Exploração J (Nov.2011)	0	0	21000	5948				
Exploração K (Nov.2011)	0	0	192700000	165010000				
Exploração F (Dez.2011)	44	42	4053750	980000	74% - 84%	-	-	18% - 50%
Exploração L (Dez.2011)	0	0	93000	2200	88%	10,4	5,4%	2%
Exploração M (Dez.2011)	0	0	0/1mL	0/1mL	95%	10,85	5,7%	1,55%
Exploração N (Jan.2012)	0	0	6266900	2021300	90%	10	6%	4,6%
Exploração O (Mar.2012)	0	4	15341000	10302250	87%	9,8	22%	11,6%

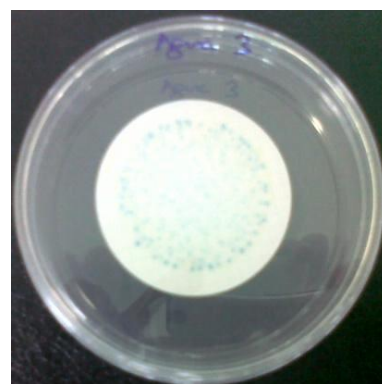
Quadro 4: Controle microbiológico das águas de consumo dos coelhos sem tratamento, ou com um tratamento incorreto; e respectivos dados de produtividade do mesmo período.

exploração	Águas de consumo com tratamento				Dados de Produtividade com tratamento			
	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i>	M.T /100mL		Fertilidade	Média de Nascidos Vivos	Mortalidade Ninho	Mortalidade Engorda
	UFC/100mL	UFC/100mL	22°C	37°C				
Exploração A					98,4%	9,7	12,6%	6%
Exploração B					91%	9,8	7,2%	2,3%
Exploração C								
Exploração D					80%	-	-	1%
Exploração E (Jan.2012)	0	0	7200	7000	86%	10	7,2%	10%
Exploração G								
Exploração H								
Exploração I (Dez.2011)	0	0	22330000	8158000				
Exploração J								
Exploração K								
Exploração F (Mai.2012)	1	1	5224500	387500	75% - 83%	-	-	10% - 20%
Exploração L (Mai.2012)	0	0	142	84	95%	11,8	12,4%	4,7%
Exploração M (Mai.2012)					96%	11,18	4%	3%
Exploração N					92%	9,75	6,5%	4,1%
Exploração O					87%	10,8	10%	10%

Quadro 5: Controle microbiológico das águas de consumo dos coelhos após efetuado tratamento, ou corrigido o tratamento; e respectivos dados de produtividade do mesmo período.



Fotografia 39: Resultado da análise microbiológica de águas com filtro em placas de S-B, com a transferência do filtro para KAA.



Fotografia 38: Resultado da análise microbiológica de águas com filtro em placas de TBX.