Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

Sara Alexandra dos Santos Cunha

Avaliação do efeito de um probiótico na performance zootécnica e microbiota entérica em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) de produção

Mestrado em
Tecnologia Bioquímica em Saúde

Setembro de 2013

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

Sara Alexandra dos Santos Cunha

Avaliação do efeito de um probiótico na performance zootécnica e microbiota entérica em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) de produção

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo Martins da Costa, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e sob co-orientação do Professor Doutor Rúben Fernandes, da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto.

Setembro de 2013

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Paulo Martins da Costa pela oportunidade dada em realizar este trabalho, bem como pela sua disponibilidade e orientação científica. Agradeço, ainda, pela confiança depositada em mim e pelo seu apoio guiando-me na aprendizagem de diversos aspetos da microbiologia e da zootecnia.

Ao Professor Doutor Rúben Fernandes pela sua orientação institucional, mostrando-se sempre disponível para ajudar e contribuir com o seu saber na resolução de alguns problemas ao longo do trabalho, bem como pela sua boa disposição e palavras encorajadoras.

À Professora Carla Oliveira pela sua valiosa ajuda neste processo, mostrando-se sempre disponível para ajudar a resolver alguns entraves que foram aparecendo, bem como pelo seu carinho, apoio e motivação.

Ao Doutor Ângelo Mendes pelos seus ensinamentos a nível laboratorial, pelas sugestões dadas, pela grande disponibilidade nas rápidas correções e pelas conversas inspiradoras.

À Doutora Lucinda pela ajuda dispensada e pela partilha de conhecimentos de genética, contribuindo para a aquisição de conhecimentos e para um aperfeiçoamento prático de algumas técnicas.

À Dona Elisabete e à Dona Sónia pelo apoio dado a nível laboratorial, tendo sido uma grande ajuda na adaptação ao laboratório.

À Diana pelo seu companheirismo nestes anos de faculdade e no laboratório, pela partilha de conhecimentos e de preocupações e pela companhia nas pausas de trabalho.

À Sílvia por sempre me ter ajudado a espairecer e divertir quando assim era necessário. Um obrigado, ainda, pela paciência demonstrada aquando da minha indisponibilidade devido à escrita da tese.

Aos meus pais e ao Sérgio, o meu agradecimento mais especial. Aos meus pais por sempre terem sido uns pais maravilhosos, por serem um exemplo a seguir, por sempre me terem motivado, apoiado e valorizado, por estarem sempre presentes nas fases mais importantes da minha vida e, por me terem proporcionado a concretização de um dos meus objetivos de vida, que era a formação a nível superior. É graças a vocês que me tornei o que sou hoje, por isso um muito obrigada com muito orgulho. Ao Sérgio pela sua paciência, pelo seu apoio incondicional, por ter estado sempre ao meu lado durante este percurso dando-me força, conforto e otimismo, alegrando-me nos dias em que tudo parecia correr mal. Foste o meu pilar durante este percurso e és a minha força para a vida.

Resumo

A cunicultura é uma atividade pecuária em crescente desenvolvimento e isso traduz-se em novos desafios. Durante muitos anos a criação de coelhos recorreu em demasia ao uso de antimicrobianos com o objetivo de tratar e prevenir o aparecimento de diversas doenças. Paralelamente, estes compostos foram também usados como "promotores de crescimento", visando essencialmente uma melhoria da eficiência digestiva. Porém, o uso indiscriminado destas substâncias levantou questões de saúde pública, como a emergência de estirpes bacterianas multirresistentes e a inerente disseminação de genes de resistência, possivelmente transferíveis ao Homem através da cadeia alimentar. No presente, existe uma enorme pressão para a adoção de estratégias que possibilitem uma redução massiva na quantidade de antimicrobianos administrados a espécies pecuárias.

Este trabalho visou contribuir para o estudo de uma alternativa ao uso de antimicrobianos - os probióticos – enquanto suplementos alimentares constituídos por microrganismos vivos capazes de equilibrar a microbiota intestinal do hospedeiro. Para tal, foram constituídos dois grupos de coelhos com base na alimentação: i) grupo antibiótico, com acesso a um alimento composto suplementado com antibióticos e ii) o grupo probiótico alimentado com a mesma dieta, mas sem antibióticos e inoculado com um probiótico constituído por *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.. Ao longo de 22 dias de estudo foram monitorizados alguns indicadores produtivos e efetuadas recolhas periódicas de fezes para estudo microbiológico. A análise dos resultados zootécnicos permitiram verificar que o uso de probióticos em detrimento de antibióticos parece promover o crescimento de coelhos, tornando-se um método mais rentável na produção cunícula. Através de genotipagem por ERIC-PCR e PFGE, pretendeu-se verificar se as estirpes estranhas ao trato gastrointestinal dos coelhos seriam capazes de coloniza-lo, permanecendo ao longo do tempo de estudo. O facto de as estirpes inoculadas no probiótico terem sido encontradas ao longo dos dias de estudo nos coelhos aos quais foram administradas, sugere que os efeitos observados na performance zootécnica estejam relacionados com as estirpes administradas no probiótico, pelo que este poderá ser um sistema viável na substituição de antibióticos na alimentação de coelhos de produção.

Palavras-chave: Antibiótico, cunicultura, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., genotipagem bacteriana, probiótico.

Abstract

Cuniculture is an animal husbandry practice in growing development which translates into new challenges. For many years, there was an overuse of antimicrobials in livestock activity with the purpose of treating and preventing several diseases. At the same time, these compounds were also used as "growth promoters", aiming for an improved digestive efficiency. However, the indiscriminate use of these substances became a public health matter, as the appearance of multi-resistant bacterial strains and its inherent dissemination of resistance genes, potentially transferable to humans through the food chain. At the present time, there is enormous pressure to adopt strategies that allow a massive reduction in the quantity of administered antimicrobials to animal husbandry.

The aim of this work is to contribute to the study of an antimicrobial alternative – probiotics - as food supplements consisting of live microorganisms capable of balancing the hosts intestinal microbiota. Thereby, two groups of rabbits were constituted based on feed: i) antibiotic group, with access to food supplemented with antibiotics and ii) probiotic group, fed with the same diet, but without antibiotics and inoculated with a probiotic consisting of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp.. Along 22 days of study, some productive indicators were monitored and periodic faecal samples were collected for microbiological study. The analyses of zootechnical results allowed to verify that the use of probiotics instead of antibiotics appears to promote their growth, making it a more cost effective method in cuniculture. Through genotyping by ERIC-PCR and PFGE, we intended to ascertain whether the strains foreign to the gastrointestinal tract of rabbits would be able to colonize it, remaining during the study period. The fact that the probiotic strains inoculated were found during the study period in rabbits administrated with them, suggests that observed effects in the zootechnical performance could be related with the strains administered in the probiotic, whereby this could be a viable substitute for antibiotics in feeding production rabbits.

Keywords: Antibiotic, cuniculture, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., bacterial genotyping, probiotic.

Índice

Agradecimentos iii

Resumo v

Abstract vi

Índice 1

Índice de abreviaturas 3

Índice de Tabelas 5

Índice de Figuras 7

Capítulo I - Introdução 9

1.Cunicultura 10

2.Uso de antimicrobianos na produção animal 11

2.1.Antimicrobianos: modo de ação 13

2.2.Mecanismos de resistência aos antimicrobianos 14

3.Probióticos 15

3.1.*Enterococcus* spp 17

3.2.Escherichia coli 19

4.Genotipagem 20

4.1.*Enterobacterial repetitive intergenic consensos* (ERIC-PCR) 21

4.2.Genotipagem por campo pulsado (PFGE) 22

Objetivos 24

Capítulo II - Materiais e Métodos 25

1.Amostras 26

2.Análise do fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. 27

3.Análise genética dos probióticos administrados e dos isolados recolhidos 28

3.1.Análise genética de *Escherichia coli* 28

3.1.1.Extração de DNA 28

3.1.2.Caracterização filogenética 29

3.1.3.Genotipagem por Electroforese em campo pulsado (PFGE) 30

3.2.Análise Genética de *Enterococcus* spp. 32

3.2.1.Extração de DNA 32

3.2.2.Identificação genética das espécies 33

3.2.3.Genotipagem por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - ERIC-PCR 35

3.3.Análise dos perfis de genotipagem 35

Capítulo III - Resultados 36

1.Análise da performance zootécnica dos coelhos 37

2.Análise microbiológica das fezes dos coelhos 41

3.Análise da prevalência das estirpes constituintes do probiótico ao longo do estudo 43

3.1.Análise das estirpes de *E. coli* 43

3.1.1.Análise do fenótipo de resistência 43

3.1.2.Análise da caracterização filogenética das estirpes constituintes do probiótico 45

3.1.3.Análise da genotipagem por PFGE 47

3.2.Análise das estirpes de *Enterococcus* spp.. 51

3.2.1.Análise do fenótipo de resistência 51

3.2.2.Análise da caracterização das espécies 53

3.2.3.Análise da genotipagem por ERIC-PCR 55

Capítulo IV - Discussão 59

Capítulo V - Conclusão 67

Referências Bibliográficas 69

Índice de abreviaturas

AB	Antibiótico
AK	Amicacina
AMC	Amoxicilina/ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
BHI	Brain heart infusion
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CN	Gentamicina
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Eritromicina
E. coli	*Escherichia coli*
ERIC-PCR	Enterobacterial repetitive intergenic consensus
F	Nitrofurantoína
FOX	Cefoxitina
IPM	Imipenem
K	Canamicina
KAA	Kanamycin aesculin azide agar base
LAB	Bactérias ácido lácticas
LMP	Low melting point agarose
MH	Mueller-Hinton
NA	Ácido nalidíxico
PB	Probiótico
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Genotipagem por campo pulsado
QD	Quinupristina/dalfopristina
RD	Rifampicina
S	Estreptomicina
S-B	Slanetz and Bartley

SXT	Sulfametoxazol/trimedoprima
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TBX	Tryptone Bile X- Glucuronide
TE	Tetraciclina
TEC	Teicoplanina
TOB	Tobramicina
UFC	Unidades formadoras de colónias
UPGMA	Unweighted pair group method using arithmetic averages
VAN	Vancomicina

Índice de Tabelas

Tabela I - Denominação utilizada para os isolados recolhidos de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. durante os 32 dias de estudo. 27

Tabela II - Primers utilizados no PCR para a deteção dos grupos filogenéticos de *E. coli* 30

Tabela III - Primers utilizados no PCR para a deteção das espécies de *Enterococcus* spp.. 34

Tabela IV - Perfis de resistência identificados ao longo do tempo de estudo..... 44

Tabela V - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) dos perfis encontrados ao longo do tempo de estudo..... 45

Tabela VI - Filogrupos identificados ao longo do tempo de estudo. 46

Tabela VII - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) dos filogrupos encontrados ao longo do tempo de estudo..... 46

Tabela VIII - Prevalência dos perfis genéticos das estirpes de *E. coli* constituintes do probiótico ao longo do tempo de estudo..... 49

Tabela VIX - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) dos perfis genéticos semelhantes às três estirpes de *E. coli* constituintes do probiótico encontrados ao longo do tempo de estudo. 49

Tabela X - Perfis de resistência identificados ao longo do tempo de estudo 52

Tabela XI - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) dos perfis encontrados ao longo do tempo de estudo..... 52

Tabela XII – Espécies de *Enterococcus* identificados ao longo do tempo de estudo. 54

Tabela XIII - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) das espécies encontradas ao longo do tempo de estudo..... 54

Tabela XIV - Prevalência dos perfis genéticos das estirpes de *Enterococcus* spp. constituintes do probiótico ao longo do tempo de estudo 58

Tabela XV - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) dos perfis genéticos semelhantes às quatro estirpes de *Enterococcus* spp. constituintes do probiótico encontrados ao longo do tempo de estudo..... 58

Índice de Figuras

Figura I - Árvore dicotómica utilizada para determinar o grupo filogenético de estirpes de *E. coli*, através da análise dos resultados de amplificação por PCR dos genes ChuA e YjaA e do fragmento de DNA TspE4.C2. (Clermont et al, 2000) 20

Figura II - Evolução do peso médio dos coelhos, em gramas e a cada 48 horas, nos dois grupos de estudo - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P) 38

Figura III - Evolução do ganho médio de peso dos coelhos, em gramas e a cada 48 horas, nos dois grupos de estudo - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P) 39

Figura IV – Evolução do consumo médio de alimento composto pelos coelhos, em gramas e cada 24 horas, nos dois grupos de estudo - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P) 39

Figura V – Evolução do índice de conversão alimentar (ICA) dos coelhos, a cada 48 horas, nos dois grupos de estudo - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P) 40

Figura VI – Evolução do consumo médio de água pelos coelhos, em mL e a cada 24 horas, nos dois grupos de estudo - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P) 40

Figura VII - Contagens microbiológicas de *E. coli* e *Enterococcus* spp. fecais, a cada 72 horas, nos dois grupos de coelhos estudados - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P) 42

Figura VIII - Comparação das contagens de *E. coli* e *Enterococcus* spp. fecais, a cada 72 horas, nos dois grupos de coelhos estudados - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P) 43

Figura IX - Imagem do gel de agarose obtido por electroforese dos produtos de amplificação do PCR para determinar grupos filogenéticos 46

Figura X - Imagem do gel de agarose obtido por PFGE para genotipagem dos isolados de *E. coli* usados no probiótico. 47

Figura XI - Dendrograma construído de acordo com os 84 isolados de *E. coli* recolhidos ao longo de três semanas e as 3 estirpes constituintes do probiótico, usando o coeficiente de similaridade de DICE e o método UPGMA 50

Figura XII - Imagem do gel de agarose obtido por electroforese dos produtos de amplificação do PCR para determinar as espécies de *Enterococcus* spp. constituintes do probiótico 53

Figura XIII - Imagem do gel de agarose obtido por ERIC-PCR para genotipagem dos isolados de *Enterococcus* spp. usados no probiótico 55

Figura XIV - Dendrograma construído de acordo com os 56 isolados de *Enterococcus* spp. recolhidos ao longo dos 32 dias de estudo e as 4 estirpes constituintes do probiótico, usando o coeficiente de similaridade de DICE e o método UPGMA..... 56

Capítulo I:

Introdução

1. Cunicultura

A cunicultura, isto é, o ramo da zootecnia que trata da criação de coelhos para fins de produção de carne, pele e pelos, para melhoramento genético, para experimentação, ou para o comércio enquanto animais de estimação, é uma atividade pecuária bastante antiga e em crescimento acentuado na Europa (Lebas et al., 1997). De facto, as últimas décadas foram marcadas por um melhoramento zootécnico geral na produção cunícula que incluiu o desenvolvimento tecnológico, nutricional, clínico e económico, manifestando-se no incremento dos índices produtivos, nomeadamente da fertilidade, da prolificidade e do ganho médio diário (Fernández-Carmona et al., 2000). A produção de coelhos com um objetivo creatopoiético está concentrada em sistemas intensivos do continente Asiático, Americano e Europeu, seguindo-se África, sendo a China o principal produtor mundial (FAO, 2011). No continente Europeu os maiores produtores são a Itália, França e Espanha (Xiccato and Trocino, 2007). Em Portugal cria-se aproximadamente de 3,5% da produção Europeia e 1,8% da produção mundial (Colin and Lebas, 1996). No passado, a intensificação destes sistemas produtivos permitiu melhorar significativamente a eficiência económica das explorações. Contudo, atualmente, o aumento dos custos de produção não tem sido acompanhado por um aumento equitativo das receitas, colocando em causa a rentabilidade do sector. Assim, é necessário que sejam aplicadas novas estratégias que fomentem a sustentabilidade económica da cunicultura (Monteiro et al., 2013).

O coelho é um mamífero lagomorfo, ou seja, faz parte do grupo de animais que inclui os Géneros *Caprolagus* (*e.g.* coelho asiático), *Sylvilagus* (*e.g.* coelho americano), *Poelagus* (*e.g*. coelho africano), *Lepus* (*e.g.* lebres) e *Oryctolagus* (*e.g.* coelho europeu) (Mourão, 2003). Na Europa, o coelho-europeu ou coelho-comum, *Oryctolagus cuniculus*, é a espécie mais empregue no sector cunícula, sendo reconhecida como uma espécie muito ativa e de hábitos noturnos. Do ponto de vista zootécnico, salienta-se o facto de as fêmeas terem uma gestação curta (cerca de 31 dias), com duas a doze crias por ninhada, podendo a taxa de mortalidade ao desmame atingir 30% (Rashwan and Marai, 2000). Numa exploração semi-intensiva, com uma boa taxa de reprodução e alimentação equilibrada, podem-se obter entre 55 e 65 crias por coelha anualmente. No caso de uma exploração extensiva, podem-se obter entre 30 a 35 crias por coelha anualmente. Porém, a produtividade, ou seja, o número de crias por coelha reprodutora num determinado

período, depende do intervalo de tempo entre ninhadas sucessivas, do tamanho das ninhadas e da taxa de sobrevivência das crias (Lebas et al., 1997).

A fase de desmame representa uma fase crítica para o coelho, observando-se, com frequência, a ocorrência de perturbações digestivas (disbacterioses) neste período. Estas podem ocorrer devido à maturação dos processos digestivos, às mudanças da dieta alimentar, ao aumento do consumo de alimentos sólidos em detrimento do leite materno e, ainda, às rações utilizadas (Gidenne, 1997; Laplace, 1972).

Nas explorações cunículas, os animais são alojados individualmente, pelo que alguns comportamentos sociais não se verificam, como é o caso da reprodução que na maioria dos casos não ocorre por acasalamento com o macho, mas sim por inseminação artificial. Finalmente, os coelhos são abatidos entre os 65 e os 75 dias, apresentando um peso médio vivo de 2,3 kg, e um rendimento de carcaça de cerca de 56% (Monteiro et al., 2013). A sua carne tem um aroma e sabor bastante característicos, sendo particularmente apreciada pelo facto de possuir um elevado teor proteico e baixo teor de gordura e colesterol (Lebas et al., 1997).

2. Uso de antimicrobianos na produção animal

Tendo em conta que os antimicrobianos (ABs) são substâncias capazes de inibir ou matar microrganismos em baixas concentrações, o seu uso por parte dos Operadores do sector primário na alimentação dos animais tem a vantagem de controlar determinados perigos sanitários e melhorar os índices produtivos, nomeadamente pela promoção do crescimento e/ou melhoria da conversão alimentar (Michelan et al., 2002). Assim, durante as últimas décadas, os antimicrobianos têm sido usados, com finalidades terapêuticas e como promotores de crescimento em animais de produção. Quando usados de forma terapêutica, os antimicrobianos são injetados ou administrados através do alimento ou água de bebida durante um prazo curto (três a 10 dias), em doses terapêuticas que possibilitem no tecido alvo uma concentração acima da concentração inibitória mínima, isto é, acima do valor mínimo de concentração para o antimicrobiano inibir o crescimento bacteriano. Por outro lado, quando usados como promotores de crescimento, os antimicrobianos são, geralmente, administrados no alimento do animal em pequenas doses de longa duração (Falcao-e-Cunha et al., 2007). Atualmente, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento está proibido na União Europeia e sobre grande escrutínio nos Estados Unidos

da América. Porém, muitos dos usos preventivos mimetizam o outrora permitido uso enquanto promotores de crescimento e visam, em última instância, a prossecução dos mesmos objetivos.

O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento é fundamentado pelo facto de estes reduzirem a flora intestinal do animal, bem como as bactérias intestinais prejudiciais ao animal. Esta diminuição reduz a "inflamação" intestinal e favorece um melhor aproveitamento digestivo do alimento. Dito de outra forma, o uso de antimicrobianos pode, por um lado, levar a uma diminuição das infeções causadas pelas bactérias patogénicas e, por outro lado, a diminuição da flora comensal e uma consequente redução na produção de metabolitos microbianos tóxicos (que afetam o crescimento do animal), uma redução do uso de nutrientes e aminoácidos pelas bactérias (aumentando os recursos nutricionais disponíveis) e, ainda, um aumento da absorção e utilização de nutrientes, devido ao aumento da superfície de absorção (Barton, 2000; Gaskins et al., 2002). Como consequência do uso de antimicrobianos, o animal iria reduzir o seu índice de conversão alimentar, isto é, a quantidade de alimento necessária (kg) para que o animal aumente o seu peso vivo em 1 kg, pelo que o animal cresceria mais rapidamente consumindo uma menor quantidade de alimento. Assim, verifica-se um menor gasto no alimento usado para os animais e a possibilidade de abater os animais com menos idade, aumentando os rendimentos do produtor e diminuindo o consumo de alimentos compostos.

Tendo em conta que uma parte da digestão do coelho é feita por micróbios, seria de esperar que o uso de antimicrobianos pudesse ser desfavorável para o animal, porém, evidências científicas mostraram que alguns promotores de crescimento poderiam ser usados de forma a melhorar a performance zootécnica do coelho (Falcao-e-Cunha et al., 2007).

Apesar das vantagens na utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento, verificou-se um intenso debate em torno do uso destas substâncias, em virtude destas práticas favorecerem o desenvolvimento de estirpes bacterianas multirresistentes, capacitando-as de genes de resistência potencialmente transferíveis ao microbiota comensal e patogénico do Homem através da cadeia alimentar (Mathur and Singh, 2005; Salyers et al., 2004). Assim, a multirresistência aos antimicrobianos constitui uma grave ameaça à saúde pública, em virtude de colocar em causa o tratamento médico de infeções bacterianas em seres humanos e animais. Assim, através do Regulamento (CE) nº 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, foi decretada a proibição da

utilização de antibióticos como promotores de crescimento, eliminando progressivamente o uso destes fármacos para fins não terapêuticos. Esta foi uma estratégia importante para tentar combater o desenvolvimento de bactérias multirresistentes devido a um uso exagerado ou indevido (Comissão Europeia, 2005). No entanto, esta proibição provocou pressão nas explorações de produção animal, pelo que foi observado um aumento substancial no uso de antimicrobianos terapêuticos (Casewell et al., 2003). Porém, mais investigação a nível de antimicrobianos promotores de crescimento e seus substitutos necessita de ser feita, em particular na cunicultura, pois a pesquisa em coelhos é muito escassa quando comparada com outras espécies de produção.

2.1. Antimicrobianos: modo de ação

Um agente antimicrobiano precisa de ter toxicidade seletiva, isto é, deve ser capaz de eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos patogénicos, não induzindo efeitos adversos no hospedeiro. O nível de toxicidade pode ser expresso em (i) dose terapêutica, ou seja, o nível de AB necessário para o tratamento clínico de uma determinada infeção e, (ii) dose tóxica, a quantidade a partir da qual o antimicrobiano se torna tóxico para o hospedeiro. Assim, define-se o índice terapêutico, o qual corresponde à razão entre a dose tóxica e a dose terapêutica. Quanto maior o índice terapêutico, mais seguro é o agente antimicrobiano (Willey et al., 2008).

Relativamente ao espectro de ação, os antimicrobianos podem ser eficazes apenas contra uma variedade limitada de agentes patogénicos – espectro de ação estreito; ou serem capazes de atuar sobre vários tipos diferentes de agentes patogénicos – espectro de ação largo (Willey et al., 2008). Para além destas características, o mecanismo de ação inerente a cada fármaco permite classificá-los como bactericidas, quando provocam a morte bacteriana, ou bacteriostáticos, quando inibem reversivelmente o crescimento, permitindo, porém, que este seja retomado caso o antimicrobiano seja removido (Leekha et al., 2011; Willey et al., 2008).

Os antimicrobianos atuam sobre o microrganismo através dos seguintes modos de ação: i) interferência com a síntese da parede celular; ii) inibição da síntese proteica; iii) inibição da síntese de ácidos nucleicos; e, iv) inibição de determinadas vias metabólicas. Os antimicrobianos β-lactâmicos, como as penincilinas e as cefalosporinas, inibem a síntese da parede celular das bactérias, pois interferem com as enzimas necessárias para a

síntese do peptidoglicano. Relativamente à inibição da síntese proteica, esta é feita por antimicrobianos macrólidos, aminoglicosídios, tetraciclinas, cloranfenicol e estreptograminas, pois estes ligam-se a uma das subunidades ribossomais, o local de síntese proteica, inibindo o crescimento bacteriano. Relativamente ao mecanismo de inibição da síntese de ácidos nucleicos, esta é feita por fluoroquinolonas, antimicrobianos que inibem a replicação do DNA, e por sulfonamidas e trimetoprim, que bloqueiam a via de síntese de ácido fólico, uma proteína hidrossolúvel essencial para a síntese de DNA (Tenover, 2006).

2.2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Certas bactérias possuem resistência intrínseca aos agentes antimicrobianos por não terem o local alvo do fármaco ou porque o princípio ativo não conseguir atravessar a parede celular de forma a atingir o seu local de ação. Porém, as bactérias sem resistência intrínseca, ou seja, as bactérias naturalmente suscetíveis ao antimicrobiano, podem adaptar-se à introdução de antimicrobianos no seu ambiente, tornando-se resistentes a estes através de mutações espontâneas ou através da transmissão de genes de outra bactéria que lhe confiram resistência (Tenover, 2006).

Em termos de mutações espontâneas existem diversos mecanismos desenvolvidos pelas bactérias que lhes permitem tornarem-se resistentes aos antimicrobianos, sendo os mais comuns os seguintes: (i) produção de enzimas capazes de modificar ou hidrolisar o antimicrobiano antes deste atuar; (ii) uso de bombas de efluxo para expulsar o antimicrobiano da célula antes de este chegar ao seu local de ação; (iii) alteração ou eliminação, por mutação, do alvo de ação do antimicrobiano de modo a que este não possua local onde se ligar; (iv) impermeabilização da parede bacteriana, de forma a que a passagem de antimicrobianos para a célula seja limitada; (v) aquisição de genes que permitam a criação de vias metabólicas por parte da bactéria que não são inibidas pelos antimicrobianos. Este tipo de resistência adquirida através de mutações é previsível, depende da presença do antimicrobiano e transmite-se verticalmente (Tenover, 2006).

No caso da transmissão genética, a resistência pode aparecer devido a (i) conjugação, na qual existe transferência de DNA por contacto entre células, (ii) transformação, em que o DNA livre originário de uma bactéria que sofreu lise celular é incorporado por uma bactéria competente, ou seja, uma bactéria apta a receber DNA

exógeno, transportando genes de resistência para uma bactéria previamente suscetível ou por (iii) transdução, na qual a transferência de material genético é mediada por bacteriófagos (Barbosa and Levy, 2000). Este tipo de aquisição de resistência é designada evolução horizontal e pode estabelecer-se entre microrganismos da mesma ou de diferentes espécies ou géneros, podendo mesmo ser transmitida entre animais e humanos (Nijsten et al., 1993).

Os microrganismos resistentes têm, naturalmente, mais vantagens de sobrevivência do que os suscetíveis, pelo que o uso continuado de antimicrobianos vai funcionar como uma pressão seletiva favorável para as estirpes resistentes, permitindo que estas sobrevivam e se multipliquem, enquanto as suscetíveis vão ser eliminadas da população (Mathur and Singh, 2005).

A questão do desenvolvimento de resistências aos antimicrobianos constitui, assim, um problema de saúde pública pelo que o seu uso na produção animal representa uma ameaça para a população humana, sendo essencial haver uma diminuição do uso de AB, recorrendo a estes apenas em casos de extrema necessidade. Porém, a redução do uso de AB causaria problemas na produção animal, o que resultaria numa queda de desempenho. Para isso, foi necessário recorrer a estudos de forma a procurar alternativas aos ABs que tenham efeitos semelhantes nos animais de produção, para que as defesas dos animais sejam melhoradas e se mantenha a eficiência da produção animal e da lucratividade do sector (Falcao-e-Cunha et al., 2007). Para este efeito, as alternativas mais estudadas e desenvolvidas são os probióticos, prebióticos, simbióticos, enzimas digestivas e ácidos orgânicos (Choct, 2009; Williams et al., 2001).

O interesse nestes aditivos alimentares começou a crescer significativamente nos anos 80, mantendo-se até à atualidade. Em animais monogástricos, existem variados estudos em suínos e aves, enquanto nos coelhos pouco tem sido investigado e, devido ao seu sistema digestivo complexo, não é possível fazer extrapolações a partir daquelas espécies (Falcao-e-Cunha et al., 2007).

3. Probióticos

Uma das primeiras alternativas, e uma das mais viáveis, para substituir os antimicrobianos são os probióticos (PBs). Segundo Fuller (1989), um probiótico é “ um

suplemento alimentar constituído de microrganismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal".

O uso de probióticos poderá ter um grande potencial na melhoria da nutrição animal e na redução do risco de doenças intestinais e, possivelmente, de outros sistemas orgânicos (Galyean and Eng, 1998). De facto, os probióticos estão inerentemente associados ao conceito de exclusão competitiva, segundo o qual espécies em competição pelos mesmos recursos não podem coexistir indefinidamente no mesmo meio. O resultado da coexistência de duas espécies nestas condições seria a dominância e, consequente prevalência da espécie que apresenta mais vantagens e a exclusão da espécie com menos vantagens (Martcheva and Li, 2013). Estudos mostraram que a exclusão competitiva apresenta diversas vantagens para o animal, nomeadamente: i) colonização intestinal por microrganismos saudáveis, prevenindo a instalação de bactérias patogénicas; ii) aumento do crescimento e peso corporal; iii) melhoria da conversão alimentar; e, iv) diminuição da taxa de mortalidade. Porém, existem alguns fatores que podem afetar negativamente a eficácia da exclusão competitiva, sendo eles o uso de antimicrobianos, o *stress* animal e as doenças (Schneitz, 2005).

Para ser considerado um probiótico, este deve possuir determinadas propriedades que são listadas seguidamente:

a) Capacidade de sobrevivência às condições ácidas do estômago de forma a puder colonizar e proliferar o intestino;
b) Ausência de patogenicidade, toxicidade, mutagenecidade ou carcinogenecidade;
c) Capacidade antagonizante da colonização por microrganismos patogénicos;
d) Estabilidade genética, não possuindo mecanismo de transferência de plasmídeos;
e) Reprodutibilidade e estabilidade aquando do processamento e armazenamento (Ziemer and Gibson, 1998).

Alguns dos microrganismos usados como probióticos são *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* spp. e *Saccharomyces* spp. (Falcao-e-Cunha et al., 2007; Fuller, 1999).

Os probióticos apresentam vários benefícios tanto para o animal como para o produtor. Para o organismo ao qual foi administrado a principal vantagem é a redução da colonização intestinal por microrganismos patogénicos, restabelecendo o balanço da microflora intestinal (Linaje et al., 2004). Para o produtor, existem vantagens tanto a nível

económico como a nível de saúde. Em termos económicos verifica-se uma melhoria nos índices económicos devido a uma maior produtividade, que se reflete através do aumento do ganho médio diário e da redução do índice de conversão alimentar. Para além disso, a aplicação de probióticos na produção pecuária, e na cunicultura em particular, tem como vantagens adicionais a restrição à dispersão ambiental de microrganismos multirresistentes e consequente redução da transferência de bactérias multirresistentes do animal para o homem (Musa et al., 2009).

Os probióticos, tal como os antimicrobianos, possuem vários mecanismos de ação, sendo estes a produção de substâncias antibacterianas (*e.g.* ácidos orgânicos e bacteriocinas), a redução das reações metabólicas que resultam na produção de substâncias tóxicas, a competição pelos recetores de adesão às células epiteliais da mucosa digestiva e, ainda, a estimulação do sistema imunitário do hospedeiro (Ouwehand et al., 1999; Ziemer and Gibson, 1998).

Existem já vários estudos feitos acerca dos probióticos, sendo que vários mostraram efeitos positivos no seu uso, principalmente quando aplicados em animais mais jovens (Falcao-e-Cunha et al., 2007). Porém, determinados trabalhos não obtiveram qualquer resultado significativo (Gardiner et al., 1999; Jin et al., 2000; Jost and Bracher-Jakob, 2000). Isto pode dever-se ao facto de os probióticos possuírem composições microbianas diferentes e, mesmo nos casos em que a composição é a mesma, há que lembrar que as estirpes podem ser diferentes. Assim, a eficácia do probiótico poderá estar dependente da quantidade de microrganismos bem como das estirpes administradas.

Verifica-se, então, que os probióticos apresentam grandes vantagens tanto em termos de saúde animal como em termos de rendimento económico para o produtor, salientando-se, porém, que apesar dos grandes esforços que têm sido feitos para compreender o modo de ação dos probióticos, o conhecimento experimental sobre os mesmo é ainda limitado. Esta é, assim, uma área muito relevante mas que necessita, ainda, de muita investigação.

3.1. *Enterococcus* spp.

As bactérias do Género *Enterococcus*, pertencentes à Família *Enterococcaceae*, são microrganismos ubíquos, mas que estão principalmente presentes no trato gastrointestinal de animais e humanos. No entanto, estas bactérias não estão apenas associadas a animais

de sangue quente, podendo também ser encontradas em diversos locais e materiais como solo, águas superficiais, águas residuais, vegetais, e alimentos, em particular naqueles derivados de animais, como lacticínios e produtos cárneos (Franz et al., 1999; Giraffa, 2002).

A identificação laboratorial de *Enterococcus* spp. apresenta peculiaridades relacionadas com o facto de partilharem características bioquímicas com bactérias de outros Géneros, nomeadamente *Streptococcus* e *Lactococcus*. Nos anos 80, com base em estudos filogenéticos, o Género *Streptococcus* foi separado em três Géneros diferentes: 1) *Enterococcus*; *2) Lactococcus*; e, 3) *Streptococcus*. Assim, as espécies inicialmente denominadas de *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus avium* e *Streptococcus gallinarum* foram transferidas para o Género *Enterococcus*, passando a ter a denominação *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium* e *Enterococcus gallinarum*, respetivamente (Schleifer and Kilpperbalz, 1984). Deste modo, desde a criação do Género *Enterococcus* têm sido introduzidas diversas espécies, sendo que atualmente fazem parte mais de 40 (Pangallo et al., 2008), as quais se dividem em sete grupos organizados de acordo com as semelhanças filogenéticas analisadas por 16S rRNA. Estes grupos são os seguintes: *E. avium*, *E. cecorum*, *E. dispar*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. saccharolyticus* (Franz et al., 2011). No entanto, *E. faecalis* e *E. faecium* continuam a ser as espécies mais importantes devido ao seu papel sanitário como indicador de qualidade dos géneros alimentícios e como probióticos (Franz et al., 1999).

Enterococcus spp. são bactérias ácido lácticas (LAB) (Devriese et al., 1993), Gram-positivo, catalase-negativo, anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas, em formas cocóides, e organizadas em pares ou pequenas cadeias. Os enterococos típicos (*E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* e *E. mundtii*) são facilmente distinguidos de outros cocos Gram-positivo, catalase-negativo e homofermentativos, como os *Streptococcus* spp. e *Lactococcus* spp., por serem capazes de crescer a 10 e a 45ºC, em meios com 6,5% de cloreto de sódio, na presença de 40% de bílis e a pH de 9.6 (Hardie and Whiley, 1997; Morrison et al., 1997). Para o isolamento de Enterococcus os meios mais utilizados são *Slanetz-Bartley médium* (S-B) e o *Kanamycin aesculin azide agar* (KAA).

Os enterococos apresentam características que os tornam úteis para o uso como probióticos no sentido de melhorar a saúde animal e humana. Um estudo desenvolvido por Vahjen e colaboradores (2002) mostrou que, através do uso de probióticos constituídos por

E. faecium, é possível incrementar substancialmente a microbiota ácido-láctica a nível intestinal. Outros estudos mostraram, ainda, que os enterococos possuem a capacidade de inibir *Listeria* spp., o que pode ser explicado pela sua relação filogenética (Stackebrandt and Teuber, 1988), mostrando mais uma das suas vantagens enquanto probióticos.

Apesar dos benefícios do uso de enterococos como probióticos, algumas questões são levantadas devido à sua aplicação segura por serem patogénicos oportunistas e por puderem transportar resistências a antimicrobianos. Porém, vários estudos foram feitos com probióticos constituídos por *Enterococcus* spp., bem como com alguns probióticos já comercializados há mais de 20 anos, e nenhum problema de segurança foi detetado, o que indica que estas espécies possam ser uma boa opção para a formulação de probióticos (Benyacoub et al., 2003; Wunderlich et al., 1989)

3.2. Escherichia coli

Escherichia coli é uma espécie de bactérias Gram-negativo, anaeróbias facultativas, catálase-positiva, oxidase-negativa, pertencentes à Família *Enterobacteriaceae*, que apresentam forma bacilar. É uma das bactérias saprófitas mais comuns nos animais de sangue quente, colonizando o seu trato intestinal pouco tempo após o nascimento, permanecendo um membro importante da flora intestinal durante toda a vida. A maioria das estirpes de *E. coli* são inofensivas, porém algumas podem ser causadores de intoxicações alimentares e doenças intestinais e extraintestinais, como diarreia, infeções urinárias e septicémia (Orskov and Orskov, 1992). A *E. coli* beneficia o hospedeiro através da produção de vitamina K (Bentley and Meganathan, 1982) e por ajudar a evitar a colonização do intestino por outros microrganismos patogénicos. Uma vez que se trata de uma bactéria coliforme de origem fecal, esta pode ser usada como indicador de contaminação fecal em águas e géneros alimentícios (Field and Samadpour, 2007).

As estirpes de *E. coli* podem ser agrupadas de acordo com quatro grupos filogenéticos, criados de acordo com o parentesco evolutivo, sendo eles A, B1, B2 e D (Herzer et al., 1990). Estes grupos distinguem-se através da combinação de três marcadores genéticos *ChuA*, *YjaA* e um fragmento de DNA TspE4.C2, os quais apresentam produtos de amplificação de 279 pb, 211 pb e 152 pb, respetivamente. Assim, de acordo com uma árvore dicotómica publicada por Clermont e colaboradores (2000) (Figura I), é possível determinar qual o filogrupo de cada estirpe. Estes filogrupos parecem

ser diferentes entre si, variando os nichos ecológicos, os perfis de resistência antimicrobiana, a taxa de crescimento e determinadas características bioquímicas, como a capacidade de utilizar diferentes fontes de açúcar (Touchon et al., 2009). Diferentes estudos filogenéticos permitiram obter as seguintes conclusões:

a) as estirpes telúricas pertencem predominantemente ao filogrupo B1;
b) as estirpes comensais pertencem, principalmente, ao filogrupos A e B1;
c) as estirpes patogénicas a nível intestinal pertencem aos filogrupos A, B1 e D;
d) as estirpes patogénicas a nível extraintestinal pertencem, maioritariamente, aos filogrupos B2 e D, pois possuem mais fatores de virulência que os restantes filogrupos. Finalmente, é assinalável que o genoma das estirpes A e B1 tende a ser menor do que o das estirpes B2 e D (Carlos et al., 2010).

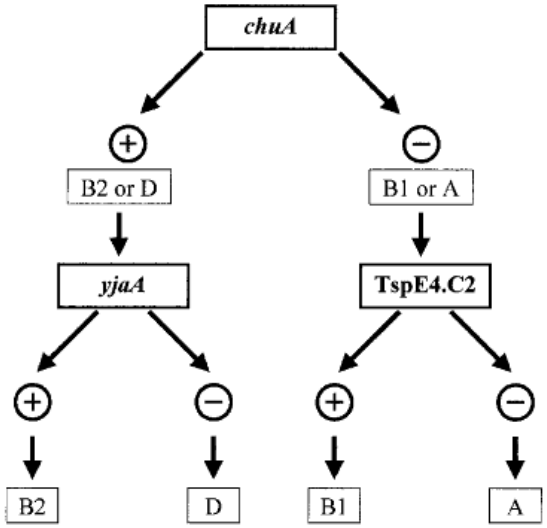


Figura I - Árvore dicotómica utilizada para determinar o grupo filogenético de estirpes de *E. coli*, através da análise dos resultados de amplificação por PCR dos genes *ChuA* e *YjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2. (Clermont et al, 2000)

4. Genotipagem

Uma das formas de determinar diferenças genéticas entre estirpes bacterianas é a genotipagem, um processo de determinação da constituição genética dos indivíduos, analisando determinadas sequências do seu DNA. Qualquer técnica de genotipagem precisa de ter uma alta capacidade de diferenciação, permitindo evidenciar de uma forma rigorosa e sensível as semelhanças ou diferenças entre os isolados microbianos. As técnicas de genotipagem podem ser utilizadas num largo espetro de organismos, entre os

quais as bactérias. Estas ferramentas genéticas começaram por ser desenvolvidas para se poderem estabelecer relações filogenéticas entre microrganismos patogénicos isolados em diferentes pacientes, podendo assim mapear a sua distribuição geográfica (Olive and Bean, 1999).

Atualmente existem diversas técnicas de genotipagem, como, por exemplo, o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), *random amplified polymorphic detection* (RAPD), sequenciação de DNA e, os métodos de interesse para este estudo, genotipagem em campo pulsado (PFGE) e *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC-PCR).

4.1. *Enterobacterial repetitive intergenic consensos* (ERIC-PCR)

A técnica de ERIC-PCR é uma das mais utilizadas para a genotipagem de microrganismos, baseando-se na identificação de elementos repetitivos localizados entre os elementos enterobacterianos repetitivos intergênicos (ERIC) (Versalovic et al., 1991). As sequências de ERIC foram inicialmente identificadas através da sequenciação dos genomas de *E. coli* e de *Salmonella typhimurium* (Hulton et al., 1991; Sharples and Lloyd, 1990), porém foram já identificados em diversas espécies (Versalovic et al., 1991), existindo já estudos realizados em algumas espécies de bactérias Gram-positivas, nomeadamente *Enterococcus* spp. (Dunne and Wang, 1997; Valenzuela et al., 2010). As sequências ERIC repetem-se no genoma bacteriano, sendo elementos altamente conservados ao nível nuclear com 126 pares de bases de comprimento. Esta sequência contém um elemento repetitivo central invertido altamente conservado, e localiza-se nas regiões extragénicas do genoma bacteriano. A posição destes elementos é variável entre espécies, constituindo um bom marcador genético para caracterizar isolados bacterianos (Versalovic et al., 1991).

Esta técnica baseia-se no uso de um *polimerase chain reaction* (PCR), utilizando um ou dois primers (ERIC1R 5‟-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA-3’ e ERIC2 5‟-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3‟), através do qual um padrão de bandas característico de cada estirpe é obtido pela amplificação de DNA genómico que se localiza entre elementos ERIC ou entre esses elementos e outras sequências de DNA repetitivas.

Esta é uma técnica simples, rápida, económica e altamente reprodutível, razão pela qual apresenta um grande potencial na genotipagem de diversos tipos de DNA.

4.2. Genotipagem por campo pulsado (PFGE)

A genotipagem por campo pulsado é uma técnica inicialmente usada para separação de *Saccharomyces cerevisae*, que permite a comparação de fragmentos de DNA de grandes dimensões (>600 kb), após a sua digestão com enzimas de restrição (Schwartz and Cantor, 1984). Atualmente esta é uma das técnicas mais utilizadas para a caraterização genotípica de diversas espécies bacterianas (Bosch et al., 2010; Miragaia et al., 2002; Tenover et al., 1995), entre as quis se encontra a *Escherichia coli* (Barrett et al., 1994; Ejrnaes et al., 2006).

No PFGE o DNA genómico necessita de ser primeiramente lisado e, uma vez que os fragmentos de DNA podem ser superiores a 500kb é necessário protegê-lo em blocos de agarose - denominados *plugs* - de modo a evitar quebras mecânicas, mas permitindo o fluxo das soluções necessárias para a lise da célula e do DNA. A agarose utilizada para formar os *plugs* apresenta baixo ponto de ebulição (*Low melting point agarose*), permitindo que se trabalhe a 37 ºC. Os *plugs* apresentam ainda a vantagem de permitir que o DNA seja guardado durante meses a 4º C, possibilitando a reprodutibilidade de experiências (Smith and Cantor, 1987).

Uma solução com elevadas concentrações de EDTA, um agente quelante, é utilizada, de modo a inibir a atividade de nucleases, em virtude de o EDTA ter a capacidade de se ligar aos iões magnésio que atuam como co-factores das DNAses. Para além disso, é utilizada proteinase K, a qual digere proteínas celulares e enzimas endógenas que seriam capazes de degradar o DNA, evitando assim tal ocorrência. Durante este processo, o DNA permanece preso no *plug*, enquanto o material que se vai soltando é libertado da agarose durante as lavagens. Após um processo de incubações e lavagens, o DNA inserido nos *plugs* é digerido com a enzima de restrição e, posteriormente, submetido a uma electroforese em campo pulsado, utilizando agarose de campo pulsado, a qual apresenta uma maior resistência do que as agarose convencional. Esta electroforese difere das standard devido à orientação do campo elétrico ao qual o gel é submetido, havendo variação na orientação ao longo do processo, o que permite a separação de fragmentos grandes de DNA (Birren and Lai, 1993). Quando ocorre troca na orientação do campo elétrico, as moléculas de DNA são reorientadas, posicionando-se paralelamente ao campo de força antes de migrarem em direção ao polo positivo. A força do campo elétrico deve ser escolhido de acordo com o tamanho das moléculas a separar, sendo que quanto maior o

fragmento, menor deverá ser a força. Assim, no caso de moléculas até 1,5 Mb usa-se, geralmente, 6 V/cm (Maule, 1998). O PFGE necessita de um aparelho de electroforese específico, sendo um dos mais utilizados o CHEF, o qual alterna campos elétricos transversais, e contém um conjunto de elétrodos cujas voltagens devem ser escolhidas de acordo com o comprimento do gel e permitem uma melhor separação de bandas. O ângulo mais utilizado neste aparelho é o de 120º C.

A temperatura utilizada no processo de PFGE é um dos pontos críticos, uma vez que alterações na temperatura de corrida vão interferir na resolução do gel, pelo que quanto maior a temperatura, mais rápida será a migração das moléculas (Maule, 1998).

As enzimas de restrição utilizadas nesta técnica são enzimas de baixa frequência, como é o caso de SmaI, AscI e ApaI, que clivam o DNA em grandes fragmentos, e diferem de espécie para espécie, originando, no final, diferentes padrões de bandas de acordo com os locais de corte da enzima. Assim, quando duas amostras semelhantes são comparadas por PFGE, o padrão de bandas originado será muito semelhante, pois os locais do DNA onde a enzima de restrição atua e o comprimento entre estes locais são os idênticos. Por outro lado, no caso de se tratarem de isolados diferentes, o local de ação da enzima de restrição e o comprimento entre esses locais será diferente, pelo que se observará um padrão de bandas diferente (Birren and Lai, 1993).

A genotipagem em campo pulsado constitui uma técnica um pouco demorada e dispendiosa, mas muito utilizada e com um poder discriminatório muito elevado.

Objetivos

Este estudo é uma continuação de um projeto previamente iniciado no laboratório de Tecnologia e Microbiologia Alimentar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, no qual dois grupos de coelhos, um com alimentação aditivada com antibióticos e outro ao qual foi administrado um probiótico, foram estudados relativamente ao seu crescimento, consumo de água e de alimento, para além da avaliação dos efeitos na microbiota entérica através da análise microbiológica das fezes.

Tendo em conta a importância do impacto do uso de antimicrobianos nos coelhos de consumo, tanto a nível económico como a nível da saúde pública, e com a finalidade de desenvolver um método que permita reduzir a administração de antimicrobianos nestes animais, este estudo teve como objetivo geral avaliar se a performance zootécnica e se a flora entérica de coelhos é afetada pela suplementação da dieta com um probiótico em detrimento do uso de antimicrobianos. Para o estudo desta hipótese estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- Comparação da performance zootécnica de ambos os grupos em estudo;
- Caracterização dos fenótipos de resistência em *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. isolados em amostras de fezes recolhidas periodicamente em ambos os grupos;
- Avaliação do impacto do probiótico na prevalência de resistências em *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.;
- Caracterização filogenética das estirpes de *E.coli* administradas no probiótico;
- Caracterização das espécies de *Enterococcus* spp. administradas no probiótico;
- Avaliação da prevalência das estirpes bacterianas inoculadas como probiótico na flora fecal dos coelhos administrados com probiótico ao longo do tempo de estudo.

Capítulo II:

Materiais e Métodos

1. Amostras

Os isolados bacterianos analisados no presente trabalho foram recolhidos num estudo anterior com 32 dias de duração. Nos primeiros 22 dias, dois grupos de seis coelhos europeus (*Oryctolagus cuniculus*) foram submetidos a alimentação diferenciada; o Grupo Antibiótico (Grupo A) teve acesso a uma alimentação composta por antibióticos [Colistina, Oxitetraciclina e Valnemulina (EcoNor®)], enquanto o alimento do Grupo Probiótico (Grupo P) era desprovido desse composto antimicrobiano, mas foi inoculado com um probiótico. Os dois grupos de coelhos haviam sido mantidos nas mesmas condições. Durante os 22 dias, o consumo de ração e de água foi registado a cada 24h, e o peso de cada animal a cada 48h.

O probiótico utilizado era constituído por sete isolados bacterianos recolhidos aleatoriamente de fezes de coelhos adultos saudáveis de duas explorações cunículas, no qual foram incluídas três estirpes de *E. coli* [ECI 1 (*E. coli* intensiva 1), ECI 2 (*E. coli* intensiva 2) e ECD (*E. coli* doméstica)] e quatro estirpes de *Enterococcus* spp. [EaI (*Enterococcus aviam* intensiva), EfaI (*Enterococcus faecalis* intensiva), EfaD (*Enterococcus faecalis* doméstica) e EfeD (*Enterococcus faecium* doméstica)]. As estirpes ECI 1, ECI 2, EaI e EfaI foram recolhidas de coelhos provenientes da mesma exploração intensiva que forneceu os coelhos para o estudo; já as amostras ECD, EfaD e EfeD foram recolhidas de coelhos de uma pequena exploração doméstica. O probiótico era preparado no dia de administração do mesmo, transferindo-se, com o auxílio de uma zaragatoa, proporções equivalentes de colónias bacterianas previamente incubadas em meio Mueller-Hinton (MH) (Oxoid®) para um frasco com 50 mL de água peptonada tamponada (APT) (Oxoid®). Foram inoculados, por via oral, 3 mL do preparado probiótico a cada coelho.

As duas primeiras administrações do probiótico incluíram todas as estirpes, porém nas administrações seguintes as estirpes de *E. coli* foram excluídas, pois verificou-se um aumento significativo no número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) de *E. coli* por grama de conteúdo fecal.

Durante 22 dias foram feitas recolhas de fezes, a cada 72 horas, para análise microbiológica. Posteriormente, os coelhos foram transportados para uma exploração cunícula doméstica, na qual os dois grupos de coelhos foram misturados, tendo-lhes sido fornecida uma alimentação mista com ração e vegetais verdes. Dez dias após o transporte dos animais para a nova exploração, foi feita uma nova recolha de fezes e respetiva análise

coprológica. Em cada amostra de fezes foram efetuadas contagens de *E. coli* em meio *Tryptone Bile X-Glucuronide* ***(****TBX agar****)*** (Oxoid®) e de *Enterococcus* spp. em meio *Slanetz and Bartley* (S-B) (Oxoid®). Em cada amostra foram isoladas seis colónias de *E. coli* e quatro colónias de *Enterococcus* spp.. Os 84 isolados de *E. coli* e os 56 isolados de *Enterococcus* spp. foram criopreservados e denominados de acordo com o dia de recolha (Tabela I).

Tabela I - Denominação utilizada para os isolados recolhidos de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. durante os 32 dias de estudo.

	Grupo	Dias						Grupo	Dia
		1	9	12	16	19	22		32
Escherichia coli	**Antibiótico (A)**	AD1 A1	A1/1	A1/1 2	A1/1 3	A1/1 4	A1/1 5	**Antibiótico + Probiótico (AP)**	AP/1 6
		AD1 A2	A1/2	A1/2 2	A1/2 3	A1/2 4	A1/2 5		AP/2 6
		AD1 A3	A1/3	A1/3 2	A1/3 3	A1/3 4	A1/3 5		AP/3 6
		AD1 A4	A2/1	A2/1 2	A2/1 3	A2/1 4	A2/1 5		AP/4 6
		AD1 A5	A2/2	A2/2 2	A2/2 3	A2/2 4	A2/2 5		AP/5 6
		AD1 A6	A2/3	A2/3 2	A2/3 3	A2/3 4	A2/3 5		AP/6 6
	Probiótico (P)	PD1 A1	P1/1	P1/1 2	P1/1 3	P1/1 4	P1/1 5		AP/7 6
		PD1 A2	P1/2	P1/2 2	P1/2 3	P1/2 4	P1/2 5		AP/8 6
		PD1 A3	P1/3	P1/3 2	P1/3 3	P1/3 4	P1/3 5		AP/9 6
		PD1 A4	P2/1	P2/1 2	P2/1 3	P2/1 4	P2/1 5		AP/10 6
		PD1 A5	P2/2	P2/2 2	P2/2 3	P2/2 4	P2/2 5		AP/11 6
		PD1 A6	P2/3	P2/3 2	P2/3 3	P2/3 4	P2/3 5		AP/12 6
***Enterococcus* spp.**	**Antibiótico (A)**	AD1 A1	A1/1	A1/1 2	A1/1 3	A1/1 4	A1/1 5	**Antibiótico + Probiótico (AP)**	AP/1 6
		AD1 A2	A1/2	A1/2 2	A1/2 3	A1/2 4	A1/2 5		AP/2 6
		AD1 A3	A2/1	A2/1 2	A2/1 3	A2/1 4	A2/1 5		AP/3 6
		AD1 A4	A2/2	A2/2 2	A2/2 3	A2/2 4	A2/2 5		AP/4 6
	Probiótico (P)	PD1 A1	P1/1	P1/1 2	P1/1 3	P1/1 4	P1/1 5		AP/5 6
		PD1 A2	P1/2	P1/2 2	P1/2 3	P1/2 4	P1/2 5		AP/6 6
		PD1 A3	P2/1	P2/1 2	P2/1 3	P2/1 4	P2/1 5		AP/7 6
		PD1 A4	P2/2	P2/2 2	P2/2 3	P2/2 4	P2/2 5		AP/8 6

2. Análise do fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.

Foi avaliado o fenótipo de resistência de cada isolado de *E. coli* e *enterococos* guardado, de forma a avaliar o impacto da administração do probiótico nos coelhos. Depois da identificação do agente procedeu-se ao antibiograma. O método utilizado consistiu na difusão em disco (técnica de Kirby-Bauer) e foi interpretado seguindo as normas do CLSI (2007).

Para *E. coli* foram testados os seguintes antibióticos: cefalotina (KF, 30µg), cefoxitina (FOX, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg), ceftazidima (CAZ, 30µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 30µg), ampicilina (AMP, 10µg), aztreonam (ATM, 30µg), imipenem (IPM, 10µg), gentamicina (CN, 10µg), canamicina (K, 30µg), tobramicina (TOB, 10µg), amicacina (AK, 30µg), estreptomicina (S, 10µg), ácido nalidíxico (NA, 30µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), cloranfenicol (C, 30µg), tetraciclina (TE, 30µg), nitrofurantoína (F, 300µg) e sulfametoxazol/trimedoprima (SXT, 25µg). Em *Enterococcus* spp. foi testada a sensibilidade aos seguintes antibióticos: ampicilina (AMP, 10µg), gentamicina (CN, 120µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), cloranfenicol (C, 30µg), tetraciclina (TE, 30µg), nitrofurantoína (F, 300µg), vancomicina (VAN, 30µg), teicoplanina (TEC, 30µg), eritromicina (E, 15µg), azitromicina (AZM, 15µg), rifampicina (RD, 5µg) e quinupristina/dalfopristina (QD, 15µg).

3. Análise genética dos probióticos administrados e dos isolados recolhidos

3.1. Análise genética de *Escherichia coli*

3.1.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA dos isolados de *Escherichia coli* foi utilizada a resina quelante *InstaGene matrix* (BioRad), de acordo com as instruções. Os isolados foram descongelados e repicados para o meio TBX, um meio seletivo para *E. coli*, e incubados a 37º C por 24h. Posteriormente, foi repicada uma colónia de TBX para MH (Mueller-Hinton) e incubada a 37º C por 24h. Ao fim desse tempo, foi repicada uma colónia de cada amostra para *eppendorfs* estéreis e Dnase/RNAse *free* contendo 1mL de água estéril e autoclavada e centrifugou-se a 12.000 rpm durante 1 minuto (SIGMA 1-14), removendo-se posteriormente o sobrenadante. Adicionou-se, de seguida, 200 µL de *InstaGene matrix* ao pellet e incubou-se a 56º C por 30 min. No final da centrifugação os *eppendorfs* foram agitados em vórtex a alta velocidade por 10s e colocados num bloco de aquecimento (Bio TDB-100) a 100º C por 8 minutos. As amostras voltaram a ser agitadas em vórtex nas condições anteriores e, centrifugadas a 12.000 rpm durante 3 min.

Os produtos de extração de DNA foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. O gel foi corrido a 150 mV durante 30 min em tampão de electroforese 1x TBE (Tampão Tris/Borato/EDTA). O gel foi fotografado num transiluminador UV (GelDoc XR System, Bio-Rad).

3.1.2. Caracterização filogenética

Para a caracterização filogenética dos probióticos e dos isolados de *E. coli* foi realizado um PCR adaptado de Clermont et al. (2000) utilizando primers que nos permitem identificar os filogrupos de cada amostra. Assim, cada reação foi realizada num volume total de 25 µL contendo: 2,5 µL de Reaction buffer 10 x [160 mM (NH4)2SO4, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % Tween-20, 25 mM MgCl2] (BioRon), 400 µM de cada dNTP (4you4 dNTP Mix 10mM, BioRon), 250 µM de MgCl2 (25 mM, Fermentas), 800 µM de cada primer, 1,25 U de DFS-Taq DNA Polymerase (5 U/µL, BioRon) e 1500 ng de DNA completando o restante volume com água estéril autoclavada. Cada reação foi realizada na presença dos primers *ChuA*, *YjaA* e TspE4C2, os quais originam produtos de amplificação nos 279, 211 e 152 pb, respetivamente (Tabela II).

O programa de amplificação foi realizado num termociclador programável (Bio-Rad MyCycler) nas seguintes condições: Desnaturação inicial de 5 minutos a 94º C; 30 ciclos de amplificação nos quais a desnaturação tem uma duração de 30 segundos a 94º C, emparelhamento de 30s a 55º C e extensão de 30s a 72º C; a extensão final tem uma duração de 7 minutos a 72º C.

Para a análise dos produtos de amplificação, estes foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. O marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb plus DNA ladder (Thermo Scientific) foi utilizado para determinação de pesos moleculares. O gel foi corrido a 150 mV durante 45 min em tampão de electroforese 1xTBE. O gel foi fotografado num transiluminador UV (GelDoc XR System, Bio-Rad).

Tabela II - Primers utilizados no PCR para a deteção dos grupos filogenéticos de *E. coli*

Gene	Sequência nucleotídica (5' 3')	Tamanho do produto (pb)
ChuA F *Chua* R	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279
YjaA F *YjaA* R	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211
TspE4C2 F TspE4C2 R	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	152

3.1.3. Genotipagem por Electroforese em campo pulsado (PFGE)

Para se proceder a uma comparação genotípica entre as estirpes de *E. coli* constituintes do probiótico e as amostras de *E. coli* isolados dos dois grupos de coelhos analisados, de forma a ser possível analisar a prevalência das estirpes de *E. coli* ao longo do estudo, recorreu-se à técnica de PFGE.

Inicialmente os isolados de *E. coli* foram descongelados e repicados para o meio TBX e incubados a 37º C por 24h. No final das 24h, foi repicada uma colónia de TBX para MH e incubada a 37º C por 24h. Seguidamente, uma colónia foi repicada de MH para 10 mL de APT e incubada a 37º C por 24h. Após as 24h, foi medida a concentração bacteriana no APT utilizando um espectrofotómetro num comprimento de onda de 600 nm e, como a concentração foi sempre entre 0,7 a 0,8, não foi necessário efetuar uma diluição do caldo anterior. Assim, procedeu-se a uma centrifugação de 1,5 mL de caldo a 10.000 rpm durante 5 minutos. O pellet foi lavado em 750 mL de água estéril e recentrifugado. O pellet resultante foi ressuspendido em 150 µl de tampão de suspensão (10mM tris pH 7.2, 20mM NaCl, 50mM EDTA) equilibrado a 50º C. Adicionou-se 150 µl de agarose *Low Melting Point* (LMP) a 2%, homogeneizou-se e colocou-se num banho seco a 50º C até se proceder à preparação dos *plugs*, para impedir que a agarose não gelifique. Para a preparação dos *plugs*, uma placa de vidro foi forrada com parafilm e, em cima desta, foram dispostas lâminas de microscópio horizontalmente e, entre estas foram depositadas várias gotículas com 20 µl da mistura anterior. Sobre estas gotículas foi sobreposta uma terceira lâmina. A placa de vidro foi incubada a 4º C durante 5 minutos. Finalizado este tempo, os *plugs*, que se encontram então agregados à lâmina, foram transferidos para novos eppendorfs aos quais foi adicionado 1 mL de tampão de lise (10mM Tris pH 7.2, 50mM NaCl, 0.2% Na *Laurylsarcosine deoxycholate*, 1% *Na laurylsarcosine*) juntamente com lisosima a uma

concentração final de 1mg/mL. Os *plugs* foram incubados a 37º C durante 2h. De seguida, o líquido foi aspirado sem danificar os *plugs* e lavados com 1 mL de água destilada estéril. Agitou-se suavemente cada eppendorf e aspirou-se a água para, em seguida, se adicionar 500 µl de Tampão Proteinase K (100mM EDTA pH8, 0.2% Na *Laurylsarcosine deoxycholate*, 1% *Na Laurylsarcosine* e proteinase K a 1mg/mL). Incubou-se por 18h num banho a 50º C. No dia seguinte a solução foi removida e adicionou-se 1 mL de Tampão de lavagem (20mM Tris pH8, 50mM EDTA), deixando durante 10 min à temperatura ambiente. Substituiu-se a solução anterior por 1 mL de Solução PMSF [14mL de tampão de lavagem e 100 µl de PMSF (*Phenilmethane sulfonyl fluoride*, um inibidor de proteinases) a 100 mM], e incubou-se à temperatura ambiente por 45 min. A solução de PMSF foi descartada e os *plugs* lavados 3 vezes com 1 mL de tampão de lavagem, sendo que em cada lavagem o tampão era deixado durante 30min à temperatura ambiente. De seguida, um só *plug* foi transferido para um novo eppendorf e incubado, à temperatura ambiente, com tampão de lavagem diluído 1:10 durante 30 min, pois a concentração mais fraca de EDTA permite a obtenção mais rápida de um equilíbrio com o tampão de digestão a ser adicionado mais tarde. O tampão foi substituído por 100 µl de um tampão adequado para a digestão enzimática, o Tampão 1X buffer tango [33mM Tris-acetato pH 7.9, 10mM acetato de magnésio, 66mM de acetato de potássio e 0.1mg/mL de BSA] (Thermo Scientific), e incubado durante 30 min à temperatura ambiente. O tampão anterior foi, então, substituído por 100 µl de Tampão 1X com enzima de restrição XbaI (10 U/µL, Thermo Scientific) à razão de 40 U/100 µl de *plug* e, incubados durante 18h a 37º C, a temperatura optima para a enzima XbaI. No dia seguinte, substituiu-se a solução anterior por 1 mL de TBE 0,5 X e refrigerou-se a 4º C.

Os *plugs* e o marcador de peso molecular, Lambda Ladder PFG Marker, foram, então, inseridos num gel de *Pulsed field Certified agarose* a 1% e, os poços selados com agarose LMP 2%. A corrida foi realizada num aparelho CHEF-DR III System (Bio-Rad) utilizando as seguintes condições: 6volts/cm com uma angulação de 120 ºC, 2s-35s durante 21h em tampão TBE 0,5% a 1b4 ºC (Ejrnaes et al., 2006). No final da corrida, o gel de agarose foi corado num banho de 0,5 µg/ml de brometo de etidio durante 45 minutos e, observado e fotografado num transiluminador UV (GelDoc XR System, Bio-Rad).

3.2. Análise Genética de *Enterococcus* spp.

3.2.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA dos isolados de enterococos, estes foram descongelados e repicados para o meio KAA **(***Kanamycin Aesculin Azide Agar Base***)** (Oxoid®), um meio seletivo para o isolamento de *Enterococcus* spp. e incubados a 37º C por 24h. Posteriormente foi repicada uma colónia de KAA para MH (*Mueller-Hinton*) (Oxoid®) e incubada a 37º C por 24h. Ao fim desse tempo, foi repicada uma colónia de cada amostra para tubos com 5mL de BHI (*Brain Heart Infusion*) (Oxoid®) e incubados a 37º C por 24h. Após as 24h foi retirado 1 mL de cada tubo para eppendorfs estéreis e Dnase/RNAse free e centrifugou-se a 7000 rpm durante 10 minutos. Após a primeira centrifugação o sobrenadante foi removido e 1mL de água destilada estéril foi adicionado, procedendo-se a uma nova centrifugação a 7000 rpm por 10 minutos, de forma a proceder à lavagem do pellet. De seguida, o sobrenadante foi novamente removido e o pellet foi ressuspendido em 500 µL de tampão SET (75 mM NaCL, 25 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7.5) e 25 µL de SDS (*Sodium dodecyl sulfate*) a 20%. A extração de DNA de *Enterococcus* spp., bactérias Gram-positivo, é mais complicada devido à dificuldade em degradar as camadas de proteção da bactéria, da cápsula de peptidoglicano e da membrana externa, pelo que foi necessário proceder a duas etapas de degradação dessas camadas. Assim, inicialmente foi adicionado 25 µL de lisostafina (SIGMA) a 1mg/mL e, as amostras, foram incubadas a 37 ºC durante 2h. Após estas duas horas, foram adicionados 2,5 µL de proteinase K a 20 mg/mL e 2,5 µL de lisozima (1g Lysozyme Molecular Biology grade, AppliChem) a 50 mg/mL, seguindo-se de uma nova incubação a 37º C por mais 2h. Finalizado o tempo de incubação adicionou-se 220 µL de NaCl a 5M e 700 µL de clorofórmio isomiálcool e misturou-se vigorosamente até obtenção de uma solução branca homogénea, centrifugando-se, de seguida, por 10 minutos a 10 000 rpm. O sobrenadante foi recolhido para um novo eppendorf estéril e, a este, foi adicionado 700 µL de isopropanol frio (-20º C), deixando a precipitar por mais 1h a -20º C. No final dessa hora, procedeu-se a uma centrifugação a 10 000 rpm por 10 minutos, removendo, posteriormente, o sobrenadante. De seguida, ressuspendeu-se o pellet em 800 µL de etanol a 70% frio (-20º C) e centrifugou-se a 10 000 rpm por 5 minutos. Por fim, removeu-se o etanol e deixou-se secar o pellet ao ar, adicionando-se, quando seco, 100 µL de água destilada estéril. O DNA foi armazenado a -20º C.

Os produtos de extração de DNA foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1,5% usando o marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb plus DNA ladder (Thermo Scientific). O gel foi corrido a 150 mV durante 30 min em tampão de electroforese 1x TBE (Tampão Tris/Borato/EDTA). O gel foi fotografado num transiluminador UV (GelDoc XR System, Bio-Rad).

3.2.2. Identificação genética das espécies

Os probióticos e os isolados de *Enterococcus* spp. foram analisados por PCR de forma a se proceder à identificação das espécies administradas aos coelhos do grupo probiótico e das espécies encontradas ao longo do tempo de estudo. Como as espécies de *Enterococcus* spp. são numerosas, os primers ou não podem ser usados todos juntos ou têm temperaturas de emparelhamento diferentes, pelo que foi necessário analisar cada amostra para diferentes grupos de primers. Assim, foram feitas quatro mix para quatro grupos de primers (Tabela III) num volume total de 25 µL, pelo que cada mix apenas variava no conjunto de primers testados e na quantidade de água adicionada. Cada amostra foi testada com os primers para *E. durans, E. faecalis, E. faecium, E. malodoratus, E.casseliflavus, E. gallinarum, E.aviam, E.Colombae, E.cecorum, E.hirae e E.raffinosus,* os quais foram agrupados em quatro grupos e originam produtos de amplificação com 295, 360, 215, 134, 288, 173, 368, 284, 371, 187 e 287 pb, respetivamente. O protocolo de identificação das espécies de *Enterococcus* spp. foi adaptado de Jackson et al. (2004).

Cada reação foi realizada num volume total de 25 µL contendo: 2.5 µL de Reaction buffer 10 x [160 mM (NH4)2SO4, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % Tween-20, 25 mM MgCl2] (BioRon), 200 µM de cada dNTP (4you4 dNTP Mix 10mM, BioRon), 500 µM de MgCl2 (Fermentas), 800 µM de primer forward e 800 µM de primer reverse, 2,5 U de DFS-Taq DNA Polymerase (5 U/µL, BioRon) e 150 ng de DNA completando o restante volume com água estéril autoclavada.

A reação foi realizada num termociclador programável (Bio-Rad MyCycler) nas seguintes condições: Desnaturação inicial de 4 minutos a 95º C; 30 ciclos de amplificação nos quais a desnaturação tem uma duração de 30 segundos a 95º C, emparelhamento de 1 minuto a 55º C e extensão de 1 minuto a 72º C; a extensão final tem uma duração de 7 minutos a 72º C.

Os produtos de amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Para a determinação dos pesos moleculares foi usado o marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb plus DNA ladder (Thermo Scientific). O gel foi corrido a 150 mV durante 45 min em tampão de electroforese 1xTBE. O gel foi fotografado num transiluminador UV (GelDoc XR System, Bio-Rad).

Tabela III - Primers utilizados no PCR para a deteção das espécies de *Enterococcus* spp.

Grupo	Espécie	Nome do primer	Sequência nucleotídica (5' 3')	Tamanho do produto (pb)
1	*E. durans*	DU 1	CCTACTGATATTAAGACAGCG	295
		DU 2	TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	
	E. faecalis	FL 1	ACTTATGTGACTAACTTAACC	360
		FL 2	TAATGGTGAATCTTGGTTTGG	
	E. faecium	FM 1	GAAAAAACAATAGAAGAATTAT	215
		FM 2	TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA	
	E. malodoratus	MA 1	GTAACGAACTTGAATGAAGTG	134
		MA 2	TTGATCGCACCTGTTGGTTTT	
2	*E. casseliflavus*	CA 1	TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC	288
		CA 2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	
	E. gallinarum	GA 1	TTACTTGCTGATTTTGATTCG	173
		GA 2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG	
3	*E .aviam*	AV 1	GCTGCGATTGAAAAATATCCG	368
		AV 2	AAGCCAATGATCGGTGTTTTT	
	E. colombae	CO 1	GAATTTGGTACCAAGACAGTT	284
		CO 2	GCTAATTTACCGTTATCGACT	
4	*E. cecorum*	CE 1	AAACATCATAAAACCTATTTA	371
		CE 2	AATGGTGAATCTTGGTTCGCA	
	E. hirae	HI 1	CTTTCTGATATGGATGCTGTC	187
		HI 2	TAAATTCTTCCTTAAATGTTG	
	E. raffinosus	RF 1	GTCACGAACTTGAATGAAGTT	287
		RF 2	AATGGGCTATCTTGATTCGCG	

3.2.3. Genotipagem por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - ERIC-PCR

De forma a ser possível fazer uma comparação genotípica entre os probióticos administrados aos dois grupos de coelhos e os isolados de *Enterococcus* spp., recorreu-se à técnica de ERIC-PCR. As reações foram realizadas num volume total de 25 µL contendo: 2,5 µL de Reaction buffer 10 x [160 mM (NH4)2SO4, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % Tween-20, 25 mM MgCl2] (BioRon), 200 µM de cada dNTP (4you4 dNTP Mix 10mM, BioRon), 250 µM de MgCl2 (25 mM, Fermentas), 200 µM de cada primer *(ERIC1R 5"-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA; ERIC2 5"-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3")*, 3,75 U de DFS-Taq DNA Polymerase (5 U/µL, BioRon) e 5 µL de DNA (30 ng/ µL) completando o restante volume com água estéril autoclavada. O programa de amplificação foi baseado em (Wei et al., 2004) e foi realizado num termociclador programável (Bio-Rad MyCycler) nas seguintes condições: Desnaturação inicial de 7 minutos a 95º C; 30 ciclos de amplificação nos quais a desnaturação tem uma duração de 30 segundos a 95º C, emparelhamento de 1 minuto a 50º C e extensão de 8 minuto a 65º C; a extensão final tem uma duração de 16 minutos a 65º C.

Para a análise dos produtos de amplificação, estes foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,5% usando o marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb plus DNA ladder (Thermo Scientific). O gel foi corrido a 150 mV durante 50 min em tampão de electroforese 1xTBE. O gel foi fotografado num transiluminador UV (GelDoc XR System, Bio-Rad).

3.3. Análise dos perfis de genotipagem

Os padrões de bandas de DNA foram analisados com recurso ao software FPQuest 4.5 (Bio-Rad). Os géis foram normalizados utilizando o marcador de peso molecular. Os níveis de similaridade entre perfis foram calculados usando o coeficiente de correlação de DICE, através do qual foi gerada uma matriz de similaridade. O dendrograma foi gerado pelo método UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*).

Capítulo III:

Resultados

1. Análise da performance zootécnica dos coelhos

No momento em que chegaram ao ICBAS, os coelhos pesavam em média 1,135 kg. Os coelhos foram aleatoriamente divididos por dois grupos. Durante as três semanas de estudo, tanto os coelhos do grupo A como os do grupo P evidenciaram um crescimento "normal", acompanhando os pesos de referência para a estirpe. Porém, a partir dos 45 dias de idade, os coelhos do grupo P demonstraram um ritmo de crescimento mais lento do que os do grupo A (Figura II). Este atraso no crescimento diário manteve-se muito acentuado até aos 47 dias de idade, verificando-se uma recuperação na fase final do ensaio, particularmente entre os 59 e 63 dias de idade (Figura III). Ainda assim, o peso médio dos coelhos do grupo A foi superior ao registado nos coelhos do grupo P (Figura II). Isso também reflete o facto de os animais do grupo P terem sido afetados por uma doença digestiva com sintomas muito semelhantes aos verificados na fase inicial da enteropatia epizoótica, cujos sinais, nomeadamente diarreia, quebra do consumo alimentar, perda de peso e elevado consumo de água, tiveram início aos 43 dias de idade e prolongaram-se por quatro dias. Por outro lado, os animais do grupo A mantiveram-se saudáveis durante todo o período de estudo.

Analisando o consumo médio de água e alimento composto, verificou-se que os animais do grupo P consumiram mais água (Figura VI), enquanto os animais do grupo A consumiram mais alimento composto (Figura IV). Relativamente ao consumo de alimento, verificou-se que, entre os 44 e os 46 dias de idade, o grupo P teve uma quebra no consumo de alimento, o qual aumentou novamente, ocorrendo uma nova quebra, porém muito menor, aos 51 dias, aumentando de novo a partir dos 54 dias, havendo aos 58 dias uma igualdade no consumo alimentar entre ambos os grupos (Figura IV). Estas fases de menor consumo de alimento composto do grupo P correspondem às fases de menor crescimento dos animais, enquanto a fase final de maior consumo coincide com a fase de maior crescimento dos mesmos. Já nos animais do grupo A o consumo manteve-se relativamente constante, observando-se que o consumo médio de alimento neste grupo é crescente em relação à idade. Assim, no final do estudo os animais do grupo A haviam consumido 10,92 kg de alimento composto, tendo cada animal consumido uma média de 3884,8 g; já os animais do grupo P haviam consumido 10,03 kg de alimento, sendo que cada animal consumiu uma média de 3574,3 g. Analisando o índice de conversão alimentar, calculado como a relação entre o consumo de alimento e o ganho de peso do animal no período de

estudo, verificou-se que os dois grupos obtiveram um valor médio muito próximo, sendo de 1,77 para o grupo A e 1,74 para o grupo P. Este índice foi relativamente constante nos animais do grupo A, enquanto no grupo P a flutuação observada acompanha a evolução clinica e as oscilações no crescimento e no consumo alimentar (Figura V). Relativamente ao consumo de água, verificou-se que este foi constante no grupo A, enquanto no grupo P foi irregular, havendo períodos de grande consumo e, logo de seguida, quebras abruptas, as quais correspondem às fases de menor consumo de alimento. Na fase final do estudo verificou-se que os animais do grupo A consumiram cerca de 12,75 L de água e os animais do grupo P 13,58 L. Assim, a diferença registada foi de cerca de 830mL (Figura VI).

a)

Idade (dias)	**Peso (g) (48h)**	
	Grupo	
	A	P
38	1141,7	1129,0
41	1267,5	1263,2
43	1347,6	1354,3
45	1428,5	1437,7
47	1517,6	1479,5
49	1614,8	1549,0
51	1717,3	1635,0
53	1813,7	1722,3
55	1901,8	1811,5
57	1993,0	1906,5
59	2084,7	2008,3
61	2181,4	2115,7
63	2275,3	2223,5
Média	1714,2	1664,3

b)

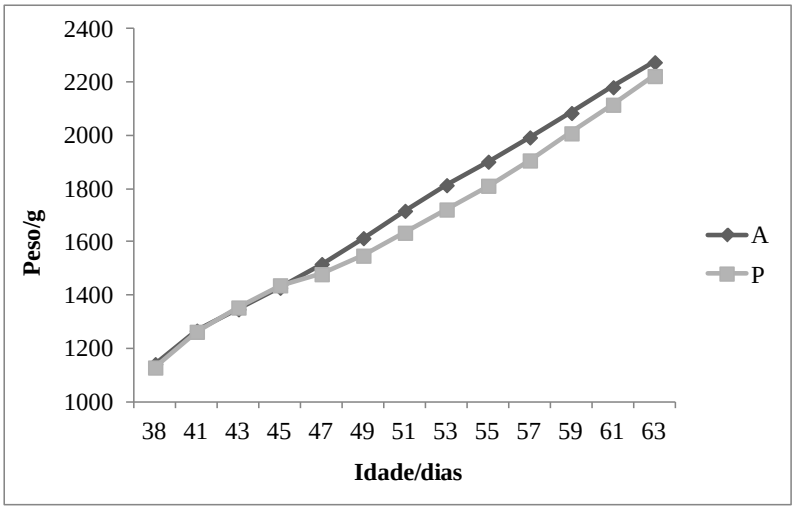


Figura II - Evolução do peso médio dos coelhos, em gramas e a cada 48 horas, nos dois grupos de estudo - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P). **a)** Tabela descritiva das pesagens dos coelhos dos dois grupos, iniciada quando estes tinham 38 dias de idade e finalizada aos 63 dias de idade. Cálculo do valor da média dos pesos dos dois grupos. **b)** Gráfico representante da evolução do peso médio dos dois grupos de coelhos a cada 48 horas, mostrando o aumento crescente do peso.

a)

Idade (dias)	Ganho de peso (g) (48h)	
	Grupo	
	A	P
41	41,94	44,72
43	40,03	45,58
45	40,44	41,67
47	44,59	20,92
49	48,60	34,75
51	51,25	43,00
53	48,17	43,67
55	44,08	44,58
57	45,58	47,50
59	45,83	50,92
61	48,39	53,67
63	46,94	53,92
Média	45,49	43,74

b)

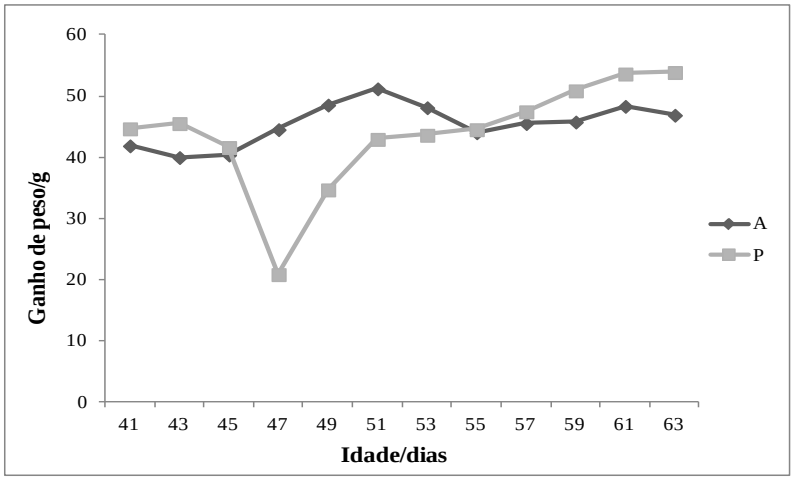


Figura III - Evolução do ganho médio de peso dos coelhos, em gramas e a cada 48 horas, nos dois grupos de estudo - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P). **a)** Tabela descritiva dos valores do ganho de peso dos coelhos dos dois grupos, iniciada quando estes tinham 41 dias de idade e finalizada aos 63 dias de idade. Cálculo do valor da média dos pesos dos dois grupos. **b)** Gráfico representante da evolução do ganho de peso médio dos dois grupos de coelhos a cada 48 horas.

a)

Idade (dias)	Consumo de alimento composto (g) (24h)	
	Grupo	
	A	P
41	403,0	379,0
42	378,6	354,2
43	410,8	387,0
44	400,6	394,2
45	407,0	371,3
46	428,9	275,5
47	425,2	306,3
48	405,9	362,4
49	475,9	388,6
50	484,6	437,2
51	489,8	455,5
52	480,5	440,6
53	501,5	406,5
54	488,6	400,4
55	483,0	454,1
56	518,7	479,9
57	520,8	504,8
58	523,0	529,7
59	516,6	515,5
60	518,3	521,0
61	555,5	557,8
62	551,1	557,8
63	551,0	556,0
Média	474,7	436,3
Total	10918,5	10034,9

b)

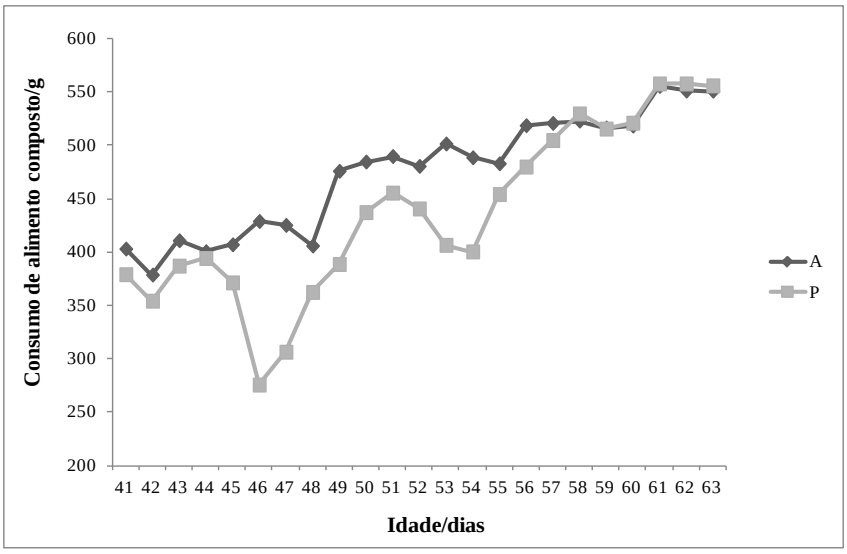


Figura IV – Evolução do consumo de alimento composto pelos coelhos, em gramas e cada 24 horas, nos dois grupos de estudo - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P). **a)** Tabela descritiva dos valores de alimento consumido, em gramas, a cada 24 horas, pelos coelhos dos dois grupos. Registo iniciado quando estes tinham 41 dias de idade e finalizada aos 63 dias de idade. Cálculo do valor da média e valor total de alimento consumido pelos dois grupos. **b)** Gráfico representante da evolução do consumo de alimento composto pelos dois grupos de coelhos a cada 24 horas.

a)

Idade (dias)	Índice de conversão alimentar (48h)	
	Grupo	
	A	P
43	1,71	1,41
45	1,68	1,49
47	1,59	2,44
49	1,63	1,86
51	1,59	1,77
53	1,74	1,55
55	1,83	1,70
57	1,90	1,77
59	1,88	1,69
61	1,91	1,73
63	1,96	1,72
Média	1,77	1,74

b)

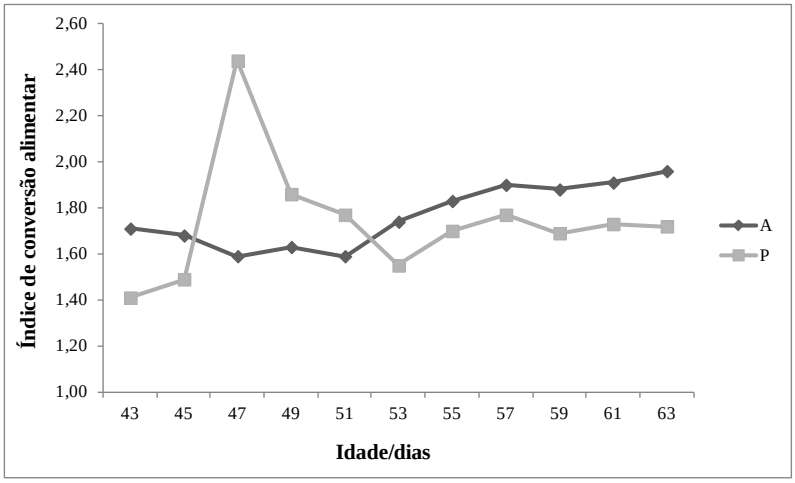


Figura V – Evolução do índice de conversão alimentar (ICA) dos coelhos, a cada 48 horas, nos dois grupos de estudo - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P). **a)** Tabela descritiva dos valores de ICA, a cada 48 horas, dos coelhos dos dois grupos. Registo iniciado quando estes tinham 43 dias de idade e finalizada aos 63 dias de idade. Cálculo do valor da média de ICA nos dois grupos. **b)** Gráfico representante da evolução do ICA nos dois grupos de coelhos a cada 48 horas.

a)

Idade (dias)	Consumo de água (mL) (24h)	
	Grupo	
	A	P
41	380,0	430,0
42	395,0	455,0
43	457,5	522,5
44	450,0	522,5
45	465,0	520,0
46	505,0	432,5
47	520,0	480,0
48	530,0	500,0
49	572,5	520,0
50	595,0	547,5
51	585,0	615,0
52	590,0	590,0
53	600,0	520,0
54	572,5	647,5
55	567,5	700,0
56	610,0	720,0
57	632,5	687,0
58	587,5	685,0
59	585,0	682,5
60	620,0	662,0
61	627,5	692,5
62	647,5	720,0
63	650,0	725,0
Média	554,1	590,3
Total	12745,0	13576,5

b)

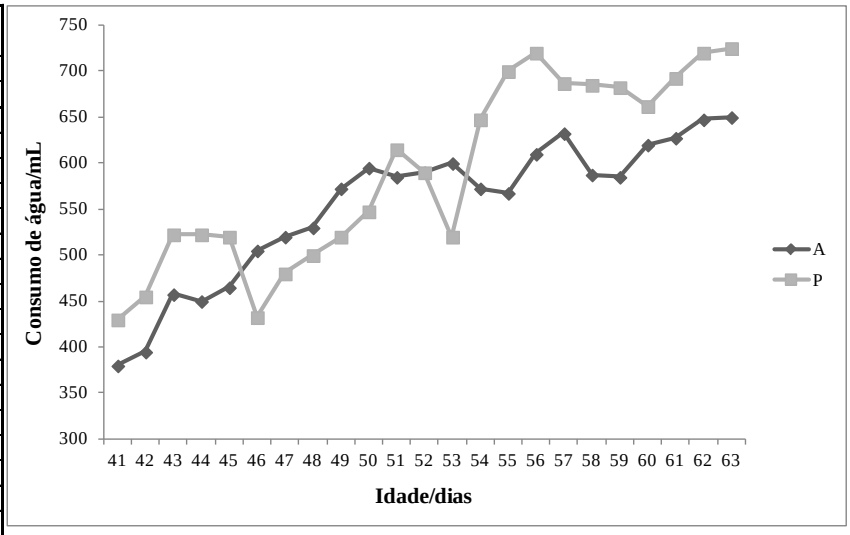


Figura VI – Evolução do consumo de água pelos coelhos, em mL e a cada 24 horas, nos dois grupos de estudo - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P). **a)** Tabela descritiva dos valores de água consumida, em mL, a cada 24 horas, pelos coelhos dos dois grupos. Registo iniciado quando estes tinham 41 dias de idade e finalizada aos 63 dias de idade. Cálculo do valor da média e valor total de água consumida pelos dois grupos. **b)** Gráfico representante da evolução do consumo de água pelos dois grupos de coelhos a cada 24 horas.

2. Análise microbiológica das fezes dos coelhos

No decorrer do estudo foram feitas recolhas de amostra de fezes de ambos os grupos de coelhos, de forma a se proceder a uma análise microbiológica das mesmas. Assim, neste processo foram feitas contagens de *E. coli* e *Enterococcus* spp. presentes nas fezes. Analisando os resultados do grupo A, verificou-se que o número de *E.coli* presentes foi superior ao número de *Enterococcus* spp. ao longo de praticamente todo o estudo, excetuando o período entre os 53 e os 59 dias de idade dos coelhos (Figura VII). No grupo P, verificou-se que as contagens de *E. coli* foram quase sempre muito superiores às de *Enterococcus* spp., com exceção da respeitante à amostra colhida no dia 59 [Figura VII c), d)].

Comparando as contagens de *E. coli* nos dois grupos, verificou-se que no grupo P estes valores foram sempre muito superiores aos do grupo A, existindo no primeiro dia de análise uma grande discrepância nestes valores, razão pela qual as estirpes de *E. coli* utilizadas na constituição do probiótico deixaram de ser inoculadas no grupo P. Porém, apesar de estas deixarem de ser inoculadas, os valores de *E. coli* continuaram a aumentar no grupo P até ao dia 47, dia em que atingiram o seu pico, correspondente a $9.9x10^8$ UFC/g, começando, a partir daí, a decrescer consideravelmente. No grupo A, os valores foram sempre inferiores aos do grupo P, verificando-se um aumento até por volta dos 50 dias de idade, altura em que as contagens atingem o seu pico máximo, correspondente a $1.7x10^7$ UFC/g. A partir deste ponto, o número de *E.coli* foi progressivamente diminuindo até aos 59 dias, momento em que voltou a aumentar até ao último dia de análise. Assim, a contagem de *E. coli* foi, em média, de $5,1x10^6$ UFC/g no grupo A e $2,4x10^8$ UFC/g no grupo P [Figura VII a), c); Figura VIII a)].

No caso de *Enterococcus* spp., estes foram encontrados, tal como as *E. coli*, em maiores quantidades no grupo P, apesar de a discrepância entre os dois grupos não ter tão grande como o ocorrido para *E. coli*. No grupo P, o número médio de *Enterococcus* spp. foi de $8,3x10^6$ UFC/g, enquanto no grupo A foi de $2,8x10^6$ UFC/g [Figura VII a), c)]. No grupo A, a contagem aumentou até ao dia 53, atingindo um pico de $9,3x10^6$ UFC/g, começando então a diminuir gradualmente até ao final do estudo. No grupo P o número de UFC aumentou de forma mais gradual até ao dia 50, aumentando mais abruptamente entre os dias 50 e 53, atingindo um pico de $2,1x10^7$ UFC/g. Entre os dias 53 e 59, houve uma

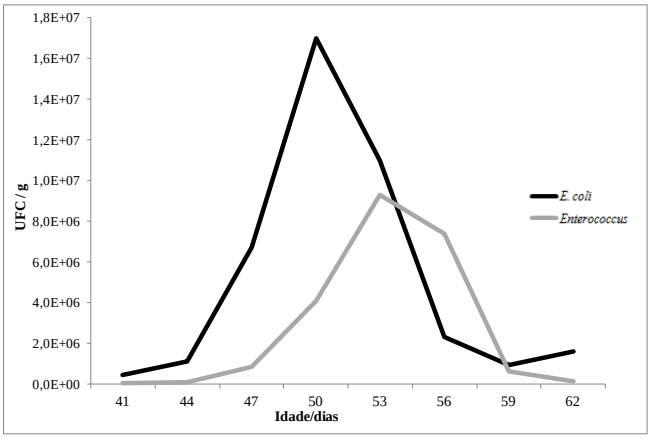
quebra no número de UFC deste Género, observando-se um ligeiro aumento no último dia de análise [Figura VIII b)].

Ao longo do estudo, verificou-se que as contagens de UFC/g tanto de *E. coli* como de enterococos nos coelhos do grupo A se mantiveram mais regulares ao longo do tempo [Figura VII a), b)], enquanto no grupo P existiram picos e quebras mais abruptas nestes valores [Figura VII c), d)]. Observou-se, ainda, que os valores das contagens se tornaram mais constantes no final do estudo, tanto para *E. coli* como para os enterococos (Figura VIII).

a)

Idade (dias)	Contagem de microrganismos no grupo A (UFC/g) (72h)	
	E. coli	*Enterococcus*
41	4,4E+05	4,3E+04
44	1,1E+06	1,1E+05
47	6,7E+06	8,7E+05
50	1,7E+07	4,1E+06
53	1,1E+07	9,3E+06
56	2,3E+06	7,4E+06
59	9,2E+05	6,4E+05
62	1,6E+06	1,3E+05
Média	5,1E+06	2,8E+06

b)



c)

Idade (dias)	Contagem de microrganismos no grupo P (UFC/g) (72h)	
	E. coli	*Enterococcus*
41	2,3E+07	1,3E+05
44	6,3E+07	1,8E+06
47	9,9E+08	2,6E+06
50	6,0E+08	4,8E+06
53	2,1E+08	5,2E+07
56	1,3E+07	2,6E+06
59	2,6E+05	9,8E+05
62	3,3E+06	1,3E+06
Média	2,4E+08	8,3E+06

d)

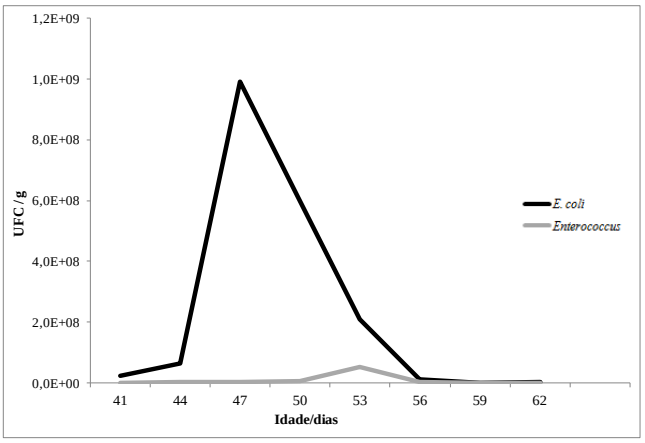


Figura VII - Contagens microbiológicas de *E. coli* e *Enterococcus* spp. fecais, a cada 72 horas, nos dois grupos de coelhos estudados - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P). **a)** Tabela descritiva das contagens de *E. coli* e *Enterococcus* spp. nos coelhos do grupo A. Registo iniciado quando estes tinham 41 dias de idade e finalizada aos 62 dias de idade. Cálculo dos valores diários e médios de cada microrganismo. **b)** Gráfico representativo da evolução das contagens de *E. coli* e *Enterococcus* spp. nos coelhos do grupo A, entre os 41 e 62 dias de idade. **c)** Tabela descritiva das contagens de *E. coli* e *Enterococcus* spp. nos coelhos do grupo P. Registo iniciado quando estes tinham 41 dias de idade e finalizada aos 62 dias de idade. Cálculo dos valores diários e médios de cada microrganismo. **d)** Gráfico representativo da evolução das contagens de *E. coli* e *Enterococcus* spp. nos coelhos do grupo P, entre os 41 e 62 dias de idade.

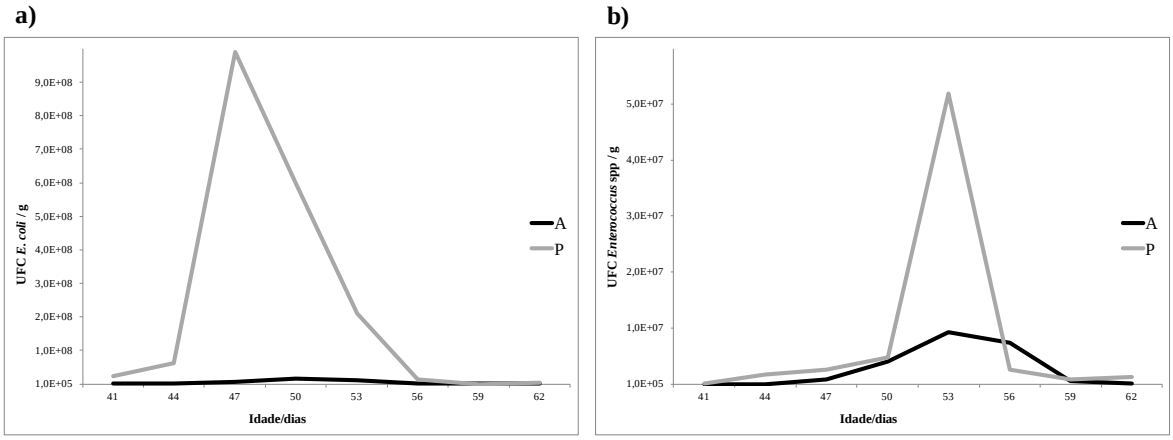


Figura VIII - Comparação das contagens de *E. coli* e *Enterococcus* spp. fecais, a cada 72 horas, nos dois grupos de coelhos estudados - grupo antibiótico (A) e grupo probiótico (P). a) Gráfico representativo da evolução das contagens de *E. coli* nos grupos A e P, a cada 72 horas. b) Gráfico representativo da evolução das contagens de *Enterococcus* spp. nos grupos A e P, a cada 72 horas.

3. Análise da prevalência das estirpes constituintes do probiótico ao longo do estudo

3.1. Análise das estirpes de *E. coli*

3.1.1. Análise do fenótipo de resistência

O probiótico administrado aos coelhos do grupo P apresentava na sua constituição três estirpes de *E. coli*, as quais foram analisadas relativamente ao seu fenótipo de resistência. Analisando os resultados obtidos nos antibiogramas realizados, verificou-se que a estirpe ECI 1 apresenta resistência aos antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, ácido nalidíxico e sulfametoxazol/trimetoprim; a estirpe ECI 2 tem um fenótipo de resistências muito semelhante ao ECI 1, apresentando resistência aos mesmos antibióticos e, adicionalmente, à tobramicina; a estirpe ECD apresenta apenas resistência ao antibiótico tetraciclina.

Ao analisar os perfis de resistência de todos os isolados recolhidos ao longo das três semanas, verificou-se a existência de 15 perfis diferentes (Tabela IV). Através da análise destes resultados verifica-se que as estirpes que apresentam perfil de resistência igual às estirpes do probiótico (perfis 1, 8 e 9 Tabela IV) foram todas recolhidas dos coelhos do

grupo P, ou seja, dos coelhos que foram inoculadas com as mesmas. Verificou-se, ainda, que no primeiro dia de análise (dia 1) apenas dois destes três perfis foram identificados (8 e 9 Tabela IV), enquanto o perfil 1 apenas começou a aparecer no dia 9. Estes perfis continuaram a aparecer ao longo dos dias de estudo, até que no dia 22 (o último dia dos animais no biotério), dos perfis iguais aos das estirpes do probiótico, apenas os perfis 1 e 8 apareceram.

Relativamente ao dia 32, o dia em que os coelhos já se encontravam todos juntos numa pequena exploração caseira, verificou-se que todas as amostras recolhidas apresentavam o mesmo perfil, sendo este completamente diferente dos perfis encontrados enquanto os coelhos estavam no biotério (Tabela IV).

Analisando as frequências de aparecimento dos vários perfis de resistência nos dois grupos de coelhos (Tabela V), verifica-se que a frequência absoluta dos perfis de resistência igual às estirpes do probiótico nos coelhos do grupo A é zero, pois nenhuma estirpe com o mesmo perfil foi encontrada neste grupo de coelhos, apresentando-se valores elevados nos coelhos do grupo P, o que mostra a prevalência destes perfis neste grupo de coelhos. A frequência relativa dos perfis nos coelhos do grupo P mostra ainda que de todos os perfis encontrados nestes coelhos, os três perfis do probiótico são muito mais frequentes do que os restantes perfis, o que parece mostrar que as estirpes do probiótico foram capazes de colonizar o intestino dos animais do grupo P. Apenas três perfis de resistência foram comuns a ambos os grupos em estudo.

Tabela IV - Perfis de resistência identificados ao longo do tempo de estudo (dias marcados de 1 a 32). As letras A, P e AP representam o grupo de coelhos antibiótico, probiótico e a mistura dos dois, respetivamente. Os valores ao longo da tabela correspondem ao número de isolados com cada perfil de resistência em cada dia nos coelhos dos grupos probiótico, antibiótico, e no último dia. Os perfis foram contabilizados sob a forma de proporção na qual o valor do denominador corresponde ao total de isolados recolhidos em cada dia em cada grupo. Os espaços em branco mostram a ausência de isolados com o perfil respetivo. Marcados a cinzento encontram-se os perfis de resistência as estirpes de *E. coli* constituintes do probiótico.

Nº perfil	Perfil Resistência	Dias												
		1		9		12		16		19		22		32
		P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	AP
1	TE			**1:6**		**3:6**				**1:6**		**3:6**		
2	TE;S							**2:6**						
3	CIP;NA											**2:6**		
4	AMP;SXT													**12:12**
5	CIP;TE;NA				**3:6**		**3:6**		**1:6**	**1:6**			**3:6**	
6	CIP;TE;NA;SXT	**1:6**							**2:6**		**3:6**			
7	AMP;TE;S;SXT			**1:6**										
8	AMP;CIP;TE;NA;SXT	**3:6**		**3:6**		**1:6**		**1:6**		**2:6**		**1:6**		
9	AMP;CIP;TE;NA;TOB;SXT	**2:6**		**1:6**		**1:6**		**2:6**		**1:6**				
10	AMP;CIP;TE;NA;SXT;K				**1:6**									
11	AMP;CIP;TE;NA;C;SXT					**1:6**								
12	AMP;CIP;TE;S,NA;C;SXT				**2:6**		**2:6**		**1:6**		**2:6**			
13	AMP;CIP;TE;NA;C;SXT;K		**6:6**											
14	AMP;CIP;TE;NA;C;TOB;SXT							**1:6**	**2:6**		**1:6**		**3:6**	
15	AMP;CIP;TE;S;NA;C;TOB;SXT						**1:6**			**1:6**				

Tabela V - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) dos perfis encontrados ao longo do tempo de estudo. Perfis encontrados tanto no conjunto total dos isolados (Isolados totais) como nos grupos de coelhos antibióticos (Grupo A), probióticos (Grupo P) e mistura dos dois grupos no último dia (Grupo AP). O sombreado a cinzento marca os perfis de resistência das estirpes de *E. coli* constituintes do probiótico e, a negrito, estão assinaladas as frequências absolutas das três estirpes administradas no probiótico nos coelhos dos grupos A, P e AP, salientando a prevalência destas estirpes nos coelhos do grupo P. Tabela construída com base na análise dos resultados da tabela IV.

Nº perfil	Perfil Resistência	Isolados totais		Grupo A		Grupo P		Grupo AP	
		FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)
1	TE	8	9,52	**0**	0,00	**8**	11,11	**0**	0,00
2	TE;S	2	2,38	0	0,00	2	2,78	0	0,00
3	CIP;NA	2	2,38	0	0,00	2	2,78	0	0,00
4	AMP;SXT	12	14,29	0	0,00	0	0,00	12	16,67
5	CIP;TE;NA	11	13,10	10	13,89	1	1,39	0	0,00
6	CIP;TE;NA;SXT	6	7,14	5	6,94	1	1,39	0	0,00
7	AMP;TE;S;SXT	1	1,19	0	0,00	1	1,39	0	0,00
8	AMP;CIP;TE;NA;SXT	11	13,10	**0**	0,00	**11**	15,28	**0**	0,00
9	AMP;CIP;TE;NA;TOB;SXT	7	8,33	**0**	0,00	**7**	9,72	**0**	0,00
10	AMP;CIP;TE;NA;SXT;K	1	1,19	1	1,39	0	0,00	0	0,00
11	AMP;CIP;TE;NA;C;SXT	1	1,19	0	0,00	1	1,39	0	0,00
12	AMP;CIP;TE;S,NA;C;SXT	7	8,33	7	9,72	0	0,00	0	0,00
13	AMP;CIP;TE;NA;C;SXT;K	6	7,14	6	8,33	0	0,00	0	0,00
14	AMP;CIP;TE;NA;C;TOB;SXT	7	8,33	6	8,33	1	1,39	0	0,00
15	AMP;CIP;TE;S;NA;C;TOB;SXT	2	2,38	1	1,39	1	1,37	0	0,00

3.1.2. Análise da caracterização filogenética das estirpes constituintes do probiótico

Através da análise do resultado da electroforese (Figura IX) e da árvore dicotómica descrita por Clermont e colaboradores (2000) (Figura I) verifica-se que as três estirpes constituintes do probiótico – ECI 1, ECI 2 e ECD - pertencem ao filogrupo B1, pois apenas apresentam um produto de amplificação de 152 pb. Relativamente aos isolados recolhidos ao longo do estudo, verificou-se que estes pertencem igualmente ao grupo filogenético B1 (Tabela VI). Desta forma, verificou-se que a frequência relativa de aparecimento deste filogrupo é de 100%, sendo que nos grupos A e P esta frequência é de 42,86% e no último dia, o grupo AP, apresenta uma frequência de 14,29%, o que corresponde às 12 amostras recolhidas neste dia (Tabela VII).

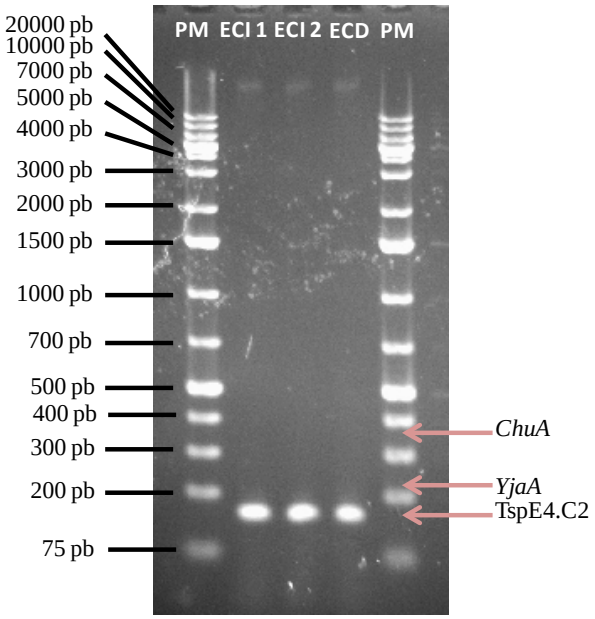


Figura IX - Imagem do gel de agarose obtido por electroforese dos produtos de amplificação do PCR para determinar grupos filogenéticos. Os poços referentes ao marcador de peso molecular (PM) e às estirpes de *E. coli* analisadas (ECI 1, ECI 2 e ECD) encontram-se assinalados a branco. À esquerda encontram-se marcados os pesos moleculares das bandas. À direita encontram-se marcados os locais das bandas correspondentes aos produtos de amplificação dos primers utilizados. As três amostras apresentam apenas produto de amplificação nos 152pb, o que corresponde ao primer TspE4.C2, o que demonstra que pertencem ao filogrupo B1.

Tabela VI - Filogrupos identificados ao longo do tempo de estudo (dias marcados de 1 a 32). As letras A, P e AP representam o grupo de coelhos antibiótico, probiótico e a mistura dos dois, respetivamente. Os valores ao longo da tabela correspondem ao número de isolados com cada filogrupo em cada dia nos coelhos dos grupos probiótico, antibiótico, e no último dia. Os isolados foram contabilizados sob a forma de proporção na qual o valor do denominador corresponde ao total de isolados recolhidos em cada dia em cada grupo. Os espaços em branco mostram a ausência de isolados com o perfil respetivo. Marcado a cinzento encontra-se o filogrupo das estirpes de *E. coli* constituintes do probiótico.

Filogrupo *E. coli*	Dias												
	1		9		12		16		19		22		32
	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	AP
A													
B1	**6:6**	**6:6**	**6:6**	**6:6**	**6:6**	**6:6**	**6:6**	**6:6**	**6:6**	**6:6**	**6:6**	**6:6**	**12:12**
B2													
D													

Tabela VII - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) dos filogrupos encontrados ao longo do tempo de estudo. Filogrupos encontrados tanto no conjunto total dos isolados (Isolados totais) como nos grupos de coelhos antibióticos (Grupo A), probióticos (Grupo P) e mistura dos dois grupos no último dia (Grupo AP). O sombreado a cinzento marca o filogrupo das estirpes de *E. coli* constituintes do probiótico. Tabela construída com base na análise dos resultados da tabela VI.

Filogrupo *E. coli*	Isolados totais		Grupo A		Grupo P		Grupo AP	
	FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)
A	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
B1	84	100,00	36	42,86	36	42,86	12	14,29
B2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
D	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

3.1.3. Análise da genotipagem por PFGE

Com a técnica de PFGE verificou-se que é possível fazer uma distinção entre as três estirpes de *E. coli* constituintes do probiótico (Figura X), pelo que se procedeu a esta técnica para a análise de todas as amostras recolhidas.

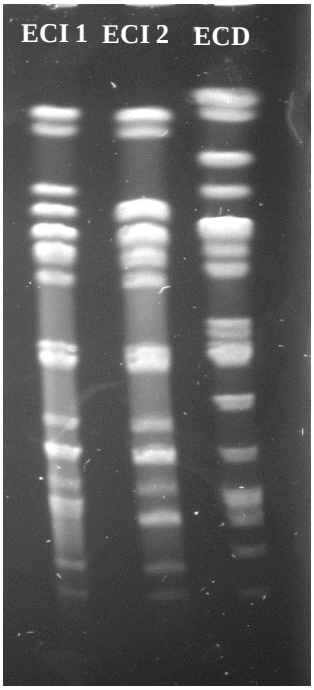


Figura X - Imagem do gel de agarose obtido por PFGE para genotipagem dos isolados de *E. coli* usados no probiótico. Os poços referentes às estirpes de *E. coli* analisadas (ECI 1, ECI 2 e ECD) encontram-se assinalados a branco.

Através da análise do dendrograma (Figura XI) utilizou-se como *cut off* delimitador da similaridade entre estirpes o valor de 90%, o que permitiu a construção de duas tabelas que definem a proximidade filogenética entre as estirpes constituintes do probiótico e as restantes amostras isoladas ao longo do tempo de estudo (Tabelas VIII e VIX).

Durante o tempo de estudo foram encontradas estirpes semelhantes às estirpes ECI 1 e ECD apenas em coelhos do grupo P. Relativamente à estirpe ECI 1, esta foi encontrada nove vezes em coelhos do grupo probiótico desde o dia 1 até ao dia 16, encontrando-se a maior quantidade no primeiro dia de análise (Figura XI C; Tabela VIII). Todas as estirpes pertencentes a este *cluster* pertencem ao mesmo filogrupo e apenas uma das amostras recolhidas no dia 1 apresenta um perfil de resistência diferente do perfil da estirpe ECI 1 (Figura XI C). Assim, as estirpes com perfil de resistência igual ao da estirpe do probiótico são resistentes aos antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, ácido nalidíxico e

sulfametoxazol/trimetoprim (perfil 8 Tabela IV), enquanto a única estirpe diferente tem um perfil semelhante excetuando a resistência à ampicilina (Perfil 6 Tabela IV).

A estirpe ECD, a única estirpe de *E. coli* usada no probiótico cuja origem é uma exploração diferente da dos coelhos utilizados, foi encontrada nove vezes nos dias 9, 12, 19 e 22 apenas em coelhos do grupo P (Figura XI A; Tabela VIII). Todas as estirpes deste *cluster* pertencem ao filogrupo B1 porém, quando analisados os perfis de resistência, verifica-se que uma das amostras apresenta um perfil diferente das restantes amostras (Figura XI A). Assim, verifica-se que a maioria das amostras deste *cluster* apresentam o mesmo perfil de resistência que a estirpe ECD, sendo resistentes apenas à tetraciclina (Perfil 1 Tabela IV), enquanto a única amostra diferente, a qual foi recolhida no dia 9, é resistente a ampicilina, tetraciclina, estreptomicina e sulfametoxazol/trimetoprim (Perfil 7 Tabela IV).

A estirpe ECI 2, uma das estirpes cuja origem é a mesma exploração cunícula dos animais usados no estudo, foi encontrada tanto em animais do grupo antibiótico como em animais do grupo probiótico. Esta foi encontrada nove vezes nos coelhos administrados com o probiótico e apenas três vezes em coelhos alimentados com antibiótico. Relativamente à presença desta estirpe nos coelhos do grupo antibiótico, esta foi encontrada apenas no dia 12, enquanto nos coelhos do grupo probiótico esta foi encontrada nos dias 1, 12, 16 e 19 (Figura XI D; Tabela VIII). Os isolados constituintes deste *cluster* pertencem ao filogrupo B1, porém verifica-se uma maior diversidade nos perfis de resistência, encontrando-se quatro perfis de resistência diferentes entre as amostras deste cluster. A estirpe ECI 2 apresenta resistência aos antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol/trimetoprim e tobramicina (Perfil 9 Tabela IV) e, com perfil de resistência igual, foram encontradas sete amostras recolhidas nos dias 1, 12, 16 e 19. Das amostras incluídas neste *cluster* recolhidas nos dias 12 e 19, quatro são resistentes a ciprofloxacina, tetraciclina e ácido nalidíxico (Perfil 5 Tabela IV). Nos dias 16 e 19, verifica-se a presença de duas estirpes com resistência a um grande número de antibióticos, sendo a isolada no dia 16 resistente à ampicilina, ciprofloxacina, tetraciclina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim e tobramicina (Perfil 14 Tabela IV), enquanto a isolada no dia 19 apresentava, para além das resistências anteriores, ainda resistência à estreptomicina (Perfil 15 Tabela IV). Verificou-se, então, que a estirpe ECI 2 apresenta uma maior frequência relativa que as restantes estirpes quando analisado o

conjunto total de isolados (14,19%), apresentando, porém, a mesma frequência relativa que as restantes estirpes nos coelhos do grupo P (10,71%) (Tabela VIX).

Através da análise do dendrograma (Figura XI B) verificou-se que as 12 estirpes recolhidas no último dia de análise, o dia 32, apresentam um perfil genético igual entre si e completamente diferente das três estirpes do probiótico (Tabela VIII) e de todas as outras estirpes recolhidas ao longo do estudo. Estas amostras apresentam ainda o mesmo filogrupo e o mesmo perfil de resistência, sendo resistentes à ampicilina e ao sulfametoxazol/trimetoprim (Perfil 4 Tabela IV). No dia 32 os coelhos já não se encontravam nas mesmas condições iniciais, tendo já sido transportados para uma pequena exploração cunícula caseira na qual os dois grupos de coelhos foram colocados juntos, pelo que neste dia deixa-se de fazer a distinção entre grupo antibiótico e grupo probiótico.

Tabela VIII - Prevalência dos perfis genéticos das estirpes de *E. coli* constituintes do probiótico ao longo do tempo de estudo. As letras A, P e AP representam o grupo de coelhos antibiótico, probiótico e a mistura dos dois, respetivamente. Os valores ao longo da tabela correspondem ao número de isolados com um perfil genético semelhante a cada probiótico em cada dia nos coelhos dos grupos probiótico, antibiótico e no último dia. Os espaços em branco mostram a ausência de isolados semelhantes ao probiótico respetivo. Tabela construída com base na análise dos resultados obtidos no dendrograma em baixo (Figura XI).

Genotipagem semelhante a:	Dias												
	1		9		12		16		19		22		32
	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	AP
ECI 1	**4:6**		**3:6**		**1:6**		**1:6**						
ECI 2	**2:6**				**1:6**	**3:6**	**3:6**		**3:6**				
ECD			**2:6**		**3:6**				**1:6**		**3:6**		

Tabela VIX - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) dos perfis genéticos semelhantes às três estirpes de *E. coli* constituintes do probiótico encontrados ao longo do tempo de estudo. Perfis encontrados tanto no conjunto total das amostras (Isolados totais) como nos grupos de coelhos antibióticos (Grupo A), probióticos (Grupo P) e mistura dos dois grupos no último dia (Grupo AP). Tabela construída com base na análise dos resultados da tabela VIII.

Genotipagem semelhante a:	Isolados totais		Grupo A		Grupo P		Grupo P	
	FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)
ECI 1	9	10,71	0	0,00	9	10,71	0	0,00
ECI 2	12	14,29	3	3,57	9	10,71	0	0,00
ECD	9	10,71	0	0,00	9	10,71	0	0,00

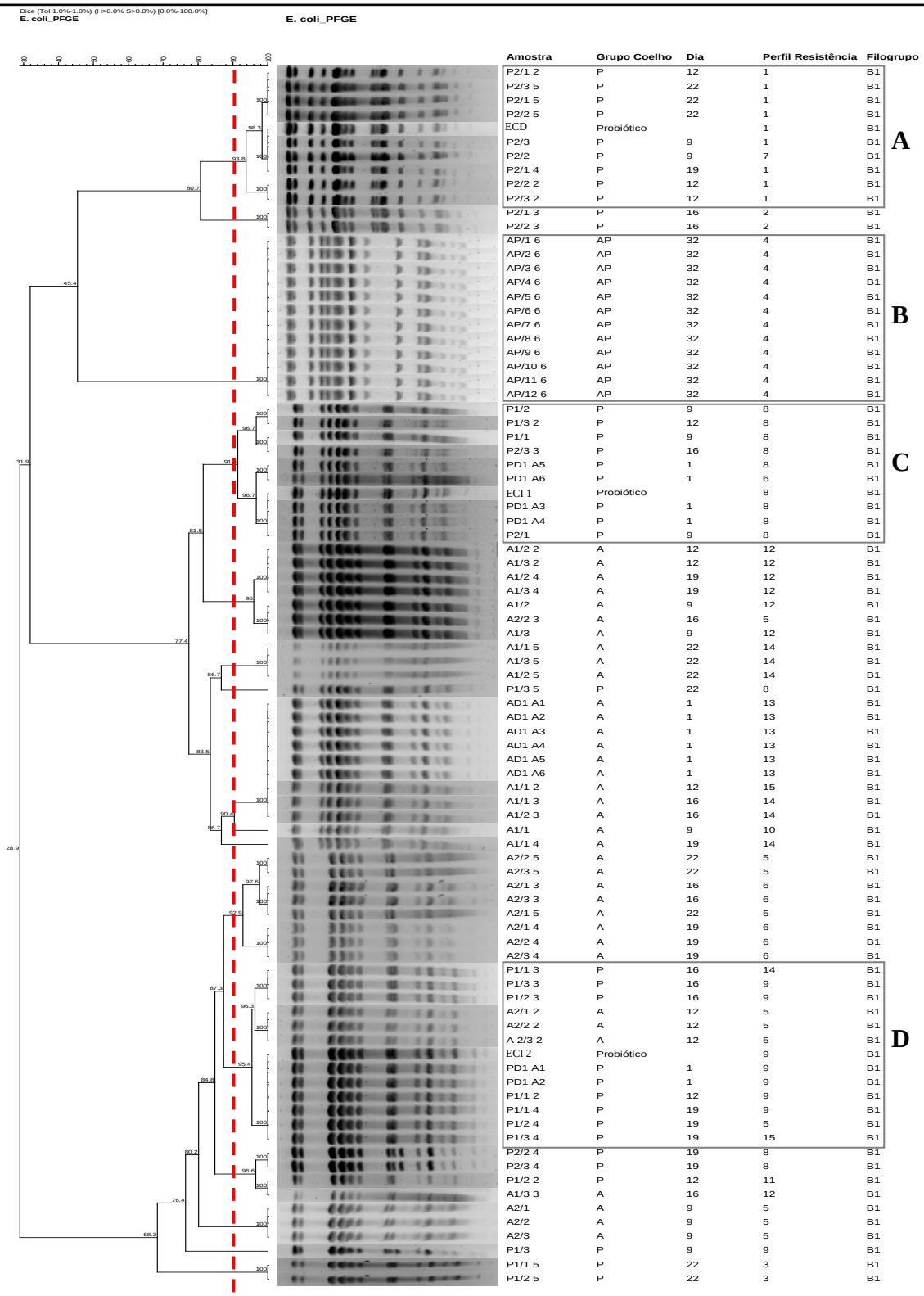


Figura XI - Dendrograma construído de acordo com os 84 isolados de *E. coli* recolhidos ao longo de três semanas e as 3 estirpes constituintes do probiótico, usando o coeficiente de similaridade de DICE e o método UPGMA. Encontram-se listadas as seguintes características de cada amostra: Nome da amostra, grupo de estudo a que pertence (grupo antibiótico - A, grupo probiótico - P e mistura dos dois – AP), dia em que foi recolhida, número do perfil de resistência correspondente (Tabela IV) e filogrupo. A linha a vermelho delimita o valor de *cut off* (90%).**A –** *Cluster* das amostras semelhantes ao probiótico ECD. **B –** *Cluster* das amostras recolhidas no último dia de estudo, dia 32. **C –** *Cluster* das amostras semelhantes ao probiótico ECI 1. **D –** *Cluster* das amostras semelhantes ao probiótico ECI 2.

3.2. Análise das estirpes de *Enterococcus* spp.

3.2.1. Análise do fenótipo de resistência

Na constituição do probiótico estavam presentes quatro estirpes de enterococos, as quais foram analisadas relativamente ao seu fenótipo de resistência. Na análise dos antibiogramas realizados, verificou-se que a estirpe EaI apresentava resistência aos antibióticos tetraciclina, eritromicina e azitromicina; a estirpe EfaI exibia resistência aos antibióticos quinupristina/dalfopristina, tetraciclina, eritromicina, azitromicina, cloranfenicol e ciprofloxacina; a estirpe EfaD apenas apresentava resistência ao antibiótico tetraciclina; por fim, temos a estirpe EfeD que era sensível a todos os antibióticos analisados.

Através da análise dos perfis de resistência de todos os isolados recolhidos, verificou-se a existência de 11 perfis de resistência diferentes (Tabela X). Os perfis de resistência semelhantes aos perfis das estirpes do probiótico encontram-se com mais frequência nos coelhos do grupo P, sendo que apenas o perfil 9 é encontrado nos coelhos do grupo A (Tabela X). O perfil 1 (igual ao perfil da amostra EfaD) não é encontrado nas recolhas dos dias 1, 9 e 12, estando presente nas amostras recolhidas nos dias 16, 19, 22 e inclusive no dia 32, dia em que os coelhos já não se encontravam no biotério. Este perfil encontra-se apenas no grupo de coelhos P, representando 8,33% dos perfis encontrados (Tabela XI). Relativamente ao perfil 7 (igual ao perfil da amostra EaI), verifica-se que este foi encontrado nas recolhas dos dias 12, 16 e 22, aparecendo apenas três estirpes com este perfil, tendo sido as três recolhidas do grupo P (Tabela X). A frequência deste perfil representa 6,25% de todos os perfis encontrados (Tabela XI). O perfil 9 (igual ao perfil da amostra EfaI) está presente nas recolhas dos dias 1, 9, 12, 16 e 22, sendo, encontrada durante dois dias em coelhos do grupo A (tabela X). No entanto, a frequência de aparecimento deste perfil nos coelhos do grupo P (14,58%) é superior à dos coelhos do grupo A (8,33%) (Tabela XI). Por fim, o perfil 11 (igual ao perfil da amostra EfeD) apenas foi encontrado em coelhos do grupo P das recolhas dos dias 9, 12, 16 e 19 (Tabela X). No total foram encontradas cinco estirpes com este perfil, o que corresponde a uma frequência de 10,42% de todos os perfis encontrados (Tabela XI). A frequência relativa dos perfis nos coelhos do grupo P mostra ainda que de todos os perfis encontrados neste grupo, os quatro perfis do probiótico são muito mais frequentes do que os restantes perfis, enquanto nos coelhos do grupo A estas estirpes quase não aparecem (Tabela X), o que parece mostrar

que as estirpes do probiótico colonizaram o intestino dos coelhos aos quais foram administrados.

Relativamente ao dia 32, o dia em que os coelhos já se encontravam todos juntos numa exploração doméstica, verificou-se que quatro das amostras recolhidas apresentam perfil igual ao perfil da amostra EfaD (perfil 1), enquanto as restantes quatro estirpes apresentam o mesmo perfil, o qual é diferente dos quatro perfis das amostras dos probióticos, sendo um perfil apenas encontrado numa única estirpe durante os dias de biotério (Tabela X).

Tabela X - Perfis de resistência identificados ao longo do tempo de estudo (dias marcados de 1 a 32). As letras A, P e AP representam o grupo de coelhos antibiótico, probiótico e a mistura dos dois, respetivamente. Os valores ao longo da tabela correspondem ao número de isolados com cada perfil de resistência em cada dia nos coelhos dos grupos probiótico, antibiótico, e no último dia. Os perfis foram contabilizados sob a forma de proporção na qual o valor do denominador corresponde ao total de isolados recolhidos em cada dia em cada grupo. Os espaços em branco mostram a ausência de isolados com o perfil respetivo. Marcados a cinzento encontram-se os perfis de resistência as estirpes de *Enterococcus* spp. constituintes do probiótico.

Nº perfil	Perfil Resistência	Dias												
		1		9		12		16		19		22		32
		P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	AP
1	TE					**2:4**				**1:4**		**1:4**		**4:8**
2	F											**1:4**		
3	TE;CIP		**2:4**											
4	CN;CIP	**1:4**												
5	QD;TE							**1:4**						
6	TE;RD									**1:4**				
7	TE;E;AZM					**1:4**		**1:4**				**1:4**		
8	TE;RD;E;AZM							**1:4**						**4:8**
9	QD;TE;E;AZM;C;CIP	**3:4**		**2:4**	**2:4**		**2:4**			**1:4**		**1:4**		
10	QD;TE;RD;E;CN;AZM;CIP		**2:4**		**2:4**		**2:4**		**4:4**		**4:4**		**4:4**	
11	Estirpes sem Resistência			**2:4**		**1:4**		**1:4**		**1:4**				

Tabela XI - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) dos perfis encontrados ao longo do tempo de estudo. Perfis encontrados tanto no conjunto total das amostras (Isolados totais) como nos grupos de coelhos antibióticos (Grupo A), probióticos (Grupo P) e mistura dos dois grupos no último dia (Grupo AP). O sombreado a cinzento marca os perfis de resistência das estirpes de *Enterococcus* spp. constituintes do probiótico e, a negrito, encontram-se assinaladas as frequências absolutas das quatro estirpes administradas como probiótico nos coelhos dos grupos A, P e AP salientando a prevalência destes perfis nos coelhos do grupo P. Tabela construída com base na análise dos resultados da tabela X.

Nº perfil	Perfil Resistência	Isolados totais		Grupo A		Grupo P		Grupo AP	
		FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)
1	TE	8	14,29	**0**	0,00	**4**	8,33	**4**	8,33
2	F	1	1,79	0	0,00	1	2,08	0	0,00
3	TE;CIP	2	3,57	2	4,17	0	0,00	0	0,00
4	CN;CIP	1	1,79	0	0,00	1	2,08	0	0,00
5	QD;TE	1	1,79	0	0,00	1	2,08	0	0,00
6	TE;RD	1	1,79	0	0,00	1	2,08	0	0,00
7	TE;E;AZM	3	5,36	**0**	0,00	**3**	6,25	**0**	0,00
8	TE;RD;E;AZM	5	8,93	0	0,00	1	2,08	4	8,33
9	QD;TE;E;AZM;C;CIP	11	19,64	**4**	8,33	**7**	14,58	**0**	0,00
10	QD;TE;RD;E;CN;AZM;CIP	18	32,14	18	37,50	0	0,00	0	0,00
11	Estirpes sem Resistência	5	8,93	**0**	0,00	**5**	10,42	**0**	0,00

3.2.2. Análise da caracterização das espécies

De forma a caracterizar as espécies de *Enterococcus* spp. utilizadas na constituição do probiótico, testou-se cada uma das estirpes com quatro grupos de primers, de forma a ser possível identificar a espécies. Assim, verificou-se que o isolado EaI pertencia à espécie *E.aviam*, pois apenas apresentou banda quando testada para o grupo 3, banda esta com 368 pb; os isolados EfaI e EfaD eram ambos *E. faecalis*, pois apresentaram uma banda nos 360 pb quando testadas para o grupo 1; já o isolado EfeD era um *E. faecium*, apresentando uma banda nos 215 pb quando testadas para o grupo 1 (Figura XII).

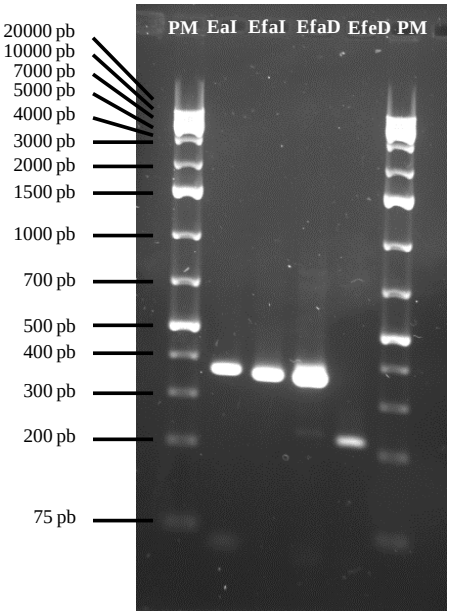


Figura XII - Imagem do gel de agarose obtido por electroforese dos produtos de amplificação do PCR para determinar as espécies de *Enterococcus* spp. constituintes do probiótico. Os poços referentes ao marcador de peso molecular (PM) e às estirpes de *Enterococcus* spp. analisadas (EaI, EfaI, EfaD e EfeD) encontram-se assinalados a branco. À esquerda encontram-se marcados os pesos moleculares das bandas do padrão de peso molecular. A amostra EaI apresentava um produto de amplificação nos 368pb quando testada para o grupo 3, pelo que se tratava de um *E. aviam*; a EfaI e a EfaD apresentavam um produto de amplificação de 360pb quando testadas para o grupo 1, tratando-se de dois *E. faecalis*; a EfeD apresentava um produto de amplificação nos 215pb quando testada para o grupo 1, tratando-se de um *E. faecium*.

As amostras recolhidas ao longo do estudo foram igualmente estudadas de forma a identificar a sua espécie, pelo que se verificou que a maioria dos isolados recolhidos (41 em 56) eram *E. faecalis*, o que corresponde a 73,21% dos isolados (Tabela XIII). Esta espécie foi encontrada em todas as amostras, tanto em coelhos do grupo A como em coelhos do grupo P (Tabela XII), encontrando-se, porém, em maior quantidade no grupo A, perfazendo neste um total de 23 isolados, correspondentes a uma frequência relativa de 41,07%. No grupo P, 14 isolados foram especiados como *E. faecalis*, o que corresponde a uma frequência relativa de apenas 25,00% (Tabela XIII). Esta espécie foi, ainda,

encontrada no 32º dia de estudo, ou seja, após os coelhos terem sido reagrupados e instalados numa exploração doméstica (Tabela XII). Em termos quantitativos, as espécies mais encontradas (a seguir à *E. faecalis)*, apesar de em muito menor quantidade, foram *E. faecium* e *E. gallinarum*, sendo encontrados sete isolados de cada espécie, o que corresponde a 12,50% dos isolados totais. Relativamente à *E. faecium* foram encontrados maioritariamente em coelhos do grupo P, no qual foram detetados em seis amostras, enquanto no grupo A apenas um isolado pertencia a esta espécie (Tabela XII). Assim, no grupo A esta espécie representou apenas 1,79% do total enquanto no grupo P representou 10,71% (Tabela XIII). A espécie *E. gallinarum* foi identificada em coelhos do grupo P e no último dia de estudo – Grupo AP, sendo de destacar que esta espécie apenas começou a aparecer a partir do dia 16, mantendo-se, então, até ao final do estudo. Entre o dia 16 e o dia 22 foi encontrado um isolado pertencente a esta espécie em cada dia, já no dia 32 foram encontrados quatro isolados (Tabela XII), o que corresponde a 7,14% dos isolados (Tabela XIII). A quarta espécie identificada foi *E. aviam*, porém esta espécie apenas apareceu uma vez (amostra recolhida no dia 16, no grupo P) (Tabela XII), pelo que representou apenas 1,79% dos isolados totais (Tabela XIII).

Tabela XII – Espécies de *Enterococcus* identificados ao longo do tempo de estudo (dias marcados de 1 a 32). As letras A, P e AP representam o grupo de coelhos antibiótico, probiótico e a mistura dos dois, respetivamente. Os valores ao longo da tabela correspondem ao número de isolados de cada espécie em cada dia nos coelhos dos grupos probiótico, antibiótico, e no último dia. Os isolados foram contabilizados sob a forma de proporção na qual o valor do denominador corresponde ao total de isolados recolhidos em cada dia em cada grupo. Os espaços em branco mostram a ausência de isolados da espécie correspondente. Marcadas a cinzento encontram-se as espécies das estirpes de *Enterococcus* constituintes do probiótico.

Espécie *Enterococcus*	Dias												
	1		9		12		16		19		22		32
	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	AP
E. faecalis	**4:4**	**3:4**	**2:4**	**4:4**	**4:4**	**4:4**	**1:4**	**4:4**	**2:4**	**4:4**	**1:4**	**4:4**	**4:8**
E. faecium		**1:4**	**2:4**				**1:4**		**1:4**		**2:4**		
E. aviam							**1:4**						
E. gallinarum							**1:4**		**1:4**		**1:4**		**4:8**

Tabela XIII - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) das espécies encontradas ao longo do tempo de estudo. Espécies encontrados tanto no conjunto total das amostras (Isolados totais) como nos grupos de coelhos antibióticos (Grupo A), probióticos (Grupo P) e mistura dos dois grupos no último dia (Grupo AP). O sombreado a cinzento marca as espécies das estirpes de *Enterococcus* constituintes do probiótico. Tabela construída com base na análise dos resultados da tabela XII.

Espécie *Enterococcus*	Isolados totais		Grupo A		Grupo P		Grupo AP	
	FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)
E. faecalis	41	73,21	23	41,07	14	25,00	4	7,14
E. faecium	7	12,50	1	1,79	6	10,71	0	0,00
E. aviam	1	1,79	0	0,00	1	1,79	0	0,00
E. gallinarum	7	12,50	0	0,00	3	5,36	4	7,14

3.2.3. Análise da genotipagem por ERIC-PCR

A técnica de ERIC-PCR foi utilizada com o objetivo de fazer uma comparação genotípica entre os isolados de enterococos recolhidos ao longo do estudo e os probióticos administrados, de forma a analisar a prevalência destes últimos na microflora dos coelhos do grupo P. Com esta técnica verificou-se que as estirpes EfaI e EfaD são muito semelhantes entre si e diferentes das restantes estirpes constituintes do probiótico (Figura XIII). Esta distinção entre as estirpes mostrou que esta técnica era adequada para verificar a prevalência destas estirpes ao longo do tempo de estudo. Desta forma, todas as amostras recolhidas ao longo das três semanas foram sujeitas a uma análise por ERIC-PCR. Foi utilizado o valor 90% como *cut off* para delimitar a similaridade entre os perfis genéticos das amostras recolhidas e entre os probióticos administrados. Com base na análise do dendrograma (Figura XIV) foram construídas duas tabelas que mostram a prevalência dos perfis genéticos ao longo do tempo de estudo (Tabelas XIV e XV).

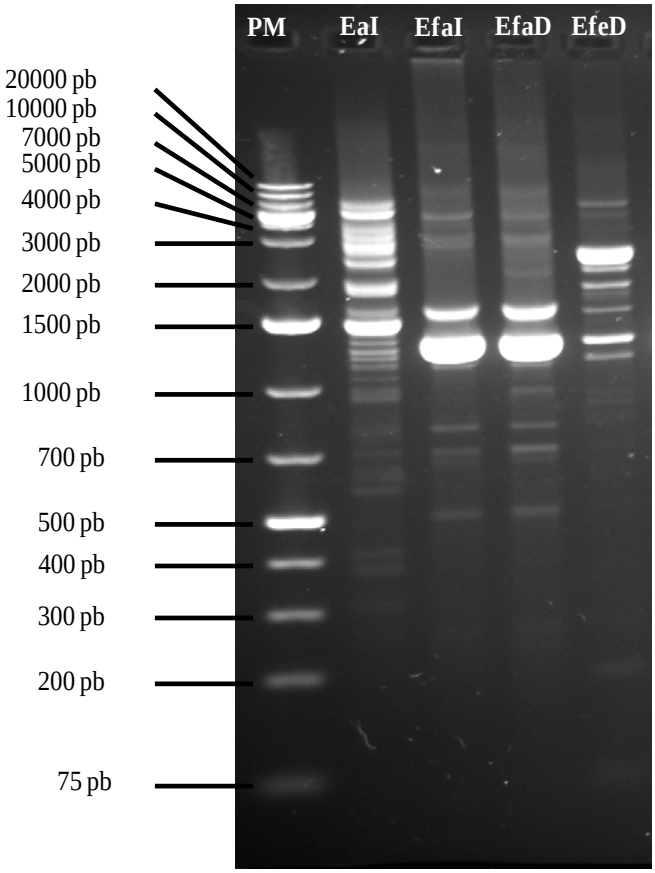


Figura XIII - Imagem do gel de agarose obtido por ERIC-PCR para genotipagem dos isolados de *Enterococcus* spp. usados no probiótico. Os poços referentes ao marcador de peso molecular (PM) e às estirpes de enterococos analisadas (EaI, EfaI, EfaD e EfeD) encontram-se assinalados a branco. À esquerda encontram-se marcados os pesos moleculares das bandas do marcador de peso molecular.

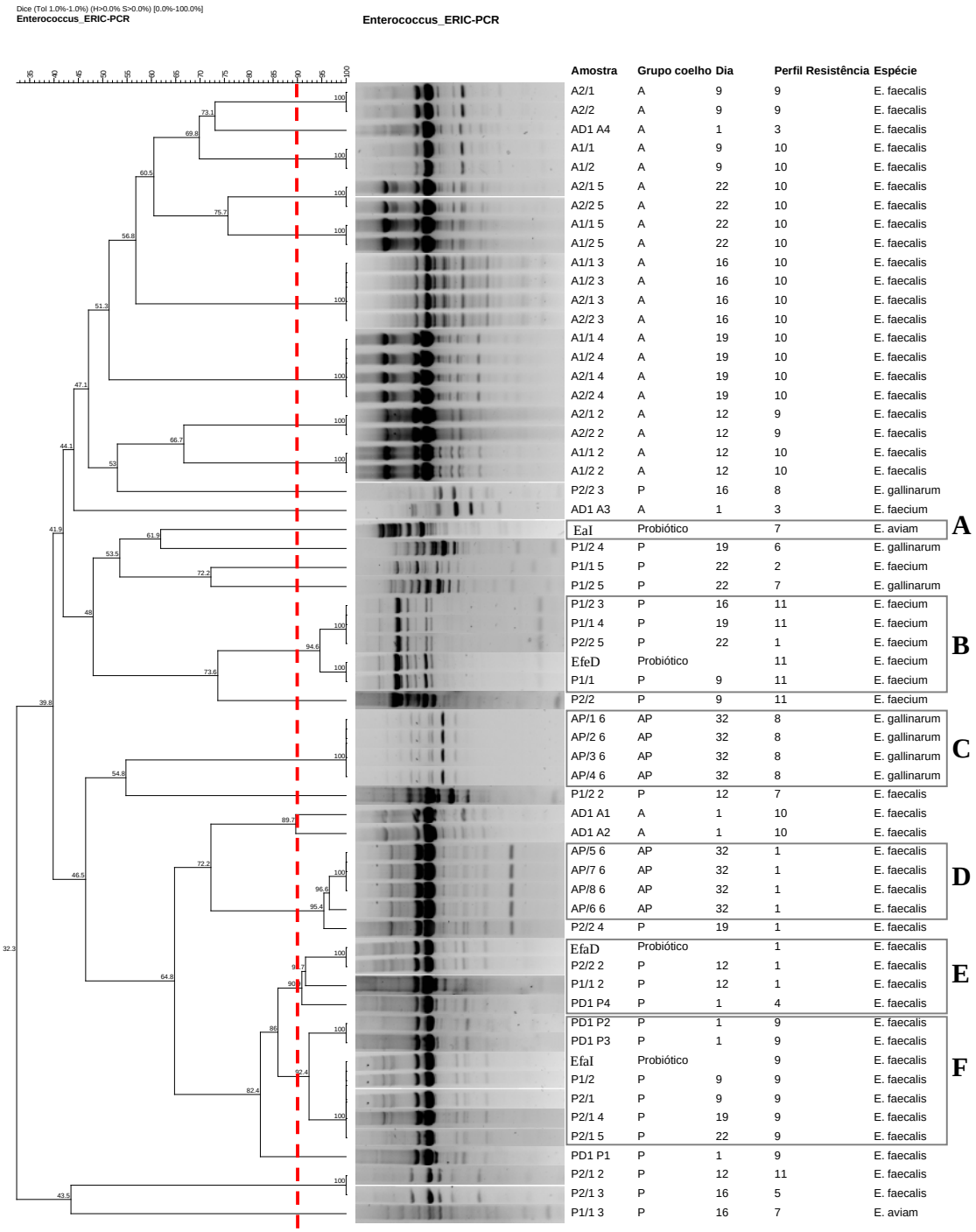


Figura XIV - Dendrograma construído de acordo com os 56 isolados de *Enterococcus* spp. recolhidos ao longo dos 32 dias de estudo e as 4 estirpes constituintes do probiótico, usando o coeficiente de similaridade de DICE e o método UPGMA. Encontram-se listadas as seguintes características de cada amostra: nome da amostra, grupo de estudo a que pertence (grupo antibiótico - A, grupo probiótico - P e mistura dos dois – AP), dia em que foi recolhida, número do perfil de resistência correspondente (Tabela X) e espécie. A linha a vermelho delimita o valor de *cut off* (90%). **A –** *Cluster* das amostras semelhantes ao probiótico EaI. **B –** *Cluster* das amostras semelhantes ao probiótico EfeD. **C, D –** Conjunto de amostras recolhidas no último dia de estudo, dia 32. **E –** *Cluster* das amostras semelhantes ao probiótico EfaD. **F –** *Cluster* das amostras semelhantes ao probiótico EfaI.

O probiótico teve na sua constituição quatro estirpes de *Enterococcus* spp. dos quais dois (EaI e EfaI) eram provenientes da mesma exploração cunícula dos coelhos usados, enquanto as outras duas (EfaD e EfeD) tinham origem em coelhos de raças diferentes provenientes de uma exploração diferente.

Através da análise dos resultados de genotipagem (Figura XIV; Tabela XIV), verificou-se que a estirpe EaI não se propagou nos animais, uma vez que não foi encontrada nenhuma estirpe semelhante ao longo dos dias de estudo (Figura XIV A). Já as restantes estirpes foram todas encontradas ao longo do estudo, porém apenas em coelhos do grupo probiótico.

No caso da estirpe EfaI, foram encontradas seis isolados semelhantes a esta estirpe no grupo P, estando presentes nos dias 1, 9, 19 e 22. Todos os isolados semelhantes apresentam o mesmo perfil de resistência e pertencem à mesma espécie da estirpe EfaI (Figura XIV F; Tabela XIV), ou seja, são *E. faecalis* resistentes aos antibióticos quinupristina/dalfopristina, tetraciclina, eritromicina, azitromicina, cloranfenicol e ciprofloxacina (Perfil 9 Tabela X). O número de isolados encontrados corresponde a 10,71% dos isolados totais (Tabela XV).

Nos coelhos do grupo P encontraram-se nos dias 1 e 12 três isolados com um padrão de bandas semelhantes à estirpe EfaD. Os três isolados eram *E. faecalis*, tal como a estirpe EfaD, porém apenas os dois isolados encontrados no dia 12 apresentam um perfil de resistência equivalente ao da estirpe EfaD (Figura XIV E; Tabela XIV), exibindo apenas resistência à tetraciclina (Perfil 1 Tabela X), enquanto a amostra do dia 1 apresenta resistência aos antibióticos gentamicina e ciprofloxacina (Perfil 4 Tabela X). Estes isolados correspondem a apenas 5,36% dos isolados totais (Tabela XV).

Relativamente à estirpe EfeD, um *E. faecium*, foram encontrados quatro isolados semelhantes no grupo P nos dia 9, 16, 19 e 22 (Figura XIV B; Tabela XIV), o que corresponde a 7,14% dos isolados totais (Tabela XV). Neste *cluster* encontrou-se apenas estirpes pertencentes à espécie *E. faecium* e dois perfis de resistência (Figura XIV B). As amostras recolhidas nos dias 9, 16 e 22 apresentam o mesmo padrão de resistências que a EfeD, ou seja, são estirpes que não apresentam resistência a qualquer antibiótico (Perfil 11 Tabela X), enquanto a amostra do dia 22 é resistente ao antibiótico tetraciclina (Perfil 1 Tabela X).

Nos oito isolados obtidos a partir da amostra recolhida no último dia de estudo, quando os coelhos se encontravam já misturados numa pequena exploração cunícula,

verificou-se que nenhum deles era semelhante a qualquer estirpe utilizada no probiótico (Figura XIV; Tabela XIV). Quatro dos isolados apresentam um perfil genético semelhante entre si e semelhante a uma estirpe isolada no dia 19. Este conjunto de cinco isolados pertencia à espécie *E. faecalis* e apresentavam o mesmo perfil de resistência (Figura XIV D), sendo resistentes à tetraciclina (Perfil 1 Tabela X). Os restantes isolados apresentam um perfil idêntico entre si mas completamente diferente das restantes amostras recolhidas ao longo do estudo, tratando-se de quatro *E. gallinarum* com o mesmo perfil de resistência (Figura XIV C), sendo resistentes aos antibióticos tetraciclina, rifampicina, eritromicina e azitromicina (Perfil 8 Tabela X).

Tabela XIV - Prevalência dos perfis genéticos das estirpes de *Enterococcus* spp. constituintes do probiótico ao longo do tempo de estudo. As letras A, P e AP representam o grupo de coelhos antibiótico, probiótico e a mistura dos dois, respetivamente. Os valores ao longo da tabela correspondem ao número de isolados com um perfil genético semelhante a cada probiótico em cada dia nos coelhos dos grupos probiótico, antibiótico e no último dia. Os espaços em branco mostram a ausência de isolados semelhantes ao probiótico respetivo. Tabela construída com base na análise dos resultados obtidos no dendrograma acima (Figura XIV).

Genotipagem semelhante a:	Dias												
	1		9		12		16		19		22		32
	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	AP
EaI													
EfaI	**2:4**		**2:4**						**1:4**		**1:4**		
EfaD	**1:4**				**2:4**								
EfeD			**1:4**				**1:4**		**1:4**		**1:4**		

Tabela XV - Frequência absoluta (FA) e frequência relativa (FR) dos perfis genéticos semelhantes às quatro estirpes de *Enterococcus* spp. constituintes do probiótico encontrados ao longo do tempo de estudo. Espécies encontradas tanto no conjunto total das amostras (Isolados totais) como nos grupos de coelhos antibióticos (Grupo A), probióticos (Grupo P) e mistura dos dois grupos no último dia (Grupo AP). Tabela construída com base na análise dos resultados da tabela XIV.

Genotipagem semelhante a:	Isolados totais		Grupo A		Grupo P		Grupo AP	
	FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)
EaI	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
EfaI	6	10,71	0	0,00	6	10,71	0	0,00
EfaD	3	5,36	0	0,00	3	5,36	0	0,00
EfeD	4	7,14	0	0,00	4	7,14	0	0,00

Capítulo IV:

Discussão

Durante 22 dias dois grupos de coelhos, diferenciados pela alimentação a que tiveram acesso, foram estudados no que toca a crescimento, quantidade de água e alimento consumidos, sintomatologia de doenças e contagens de *E. coli* e *Enterococcus* spp. em amostras fecais recolhidas regularmente. Os coelhos do grupo A foram submetidos a uma alimentação composta aditivada com antibióticos enquanto a alimentação dos coelhos do grupo P, tendo exatamente a mesma formulação, não continha os antimicrobianos. Este grupo recebeu, por via oral, um preparado empírico contendo estirpes de *E. coli* e enterococos isolados a partir de amostras fecais recolhidas em coelhos adultos saudáveis criados na exploração de origem dos láparos em estudo e, também, numa exploração doméstica.

Os coelhos do grupo A não manifestaram quaisquer sinais patológicos durante todo o período de estudo e, apresentaram-se estáveis em todos os parâmetros avaliados. Estes animais apresentaram um crescimento médio regular, aumentando o peso em cerca de 45g por dia. Relativamente aos coelhos do grupo probiótico, verificou-se que os parâmetros avaliados foram mais oscilantes, tendo ocorrido um crescimento mais variável e marcado pela desaceleração entre os 45 e os 47 dias de idade, período durante o qual se verificou uma diminuição no consumo de alimento. Alguns dos coelhos deste grupo apresentaram diarreias a partir dos 43 dias de idade e, uma vez que os animais não foram tratados, de modo a que o uso de medicamentos não invalidasse os resultados do estudo, estes permaneceram com sintomatologia durante quatro dias, ou seja, até os 46 dias de idade. Assim, esta fase de menor consumo de alimento e menor ganho de peso coincidiram com a fase de diarreias, clinicamente muito semelhante a casos de enteropatia epizoótica, uma vez que esta afeção é caracterizada por uma distensão abdominal com emissão de pequenas quantidades de excrementos aquosos, seguidos por uma diminuição no consumo de alimento e um elevado consumo de água (Licois et al., 2005). Assim, a variabilidade observada nos parâmetros avaliados nos coelhos do grupo P poderá ser explicada com base na sintomatologia digestiva ocorrida entre os 43 e os 46 dias de idade, a qual terá afetado a atividade normal dos coelhos. Após este período, estes animais começaram a recuperar o peso, atingindo um ganho de peso equivalente ao dos animais do grupo A aos 55 dias de idade e, apresentando um maior ganho de peso (que o grupo A) a partir dessa fase e até ao final do estudo. Esta observação deve-se a um fenómeno de extrema importância na produção animal, denominado de crescimento compensatório, o qual foi estudado em diversos animais, e definido como um crescimento mais rápido que o normal após um período de restrição nutritiva (Bohman, 1955) . Um estudo realizado em coelhos, no qual

um grupo teve a sua alimentação restringida entre os 35 e os 42 dias de idade, mostrou que os animais quando alimentados de forma restrita apresentam um crescimento compensatório diário após o período de restrição, apresentando um ganho de peso 40% superior ao dos coelhos cuja alimentação não foi restringida (Tůmová et al., 2002). Assim, no final, observou-se que os coelhos do grupo P foram capazes de recuperar da sintomatologia ocorrida sem recurso a antibióticos, permitindo que estes acabassem o estudo com um peso médio de 2223,5 g. No caso de o estudo ter sido realizado num período de tempo mais alargado, seria de esperar que os animais do grupo P ultrapassassem o peso dos animais do grupo A. Assim, aos 63 dias de idade os coelhos do grupo A pesavam em média 2275,3 g e os coelhos do grupo P 2223,5 g, uma pequena diferença que permite inferir que aquando da idade mais frequente de abate, frequente de abate - 70 dias de idade - os dois grupos de coelhos teriam uma performance produtiva semelhante. Alguns estudos mostram o benefício do uso de probióticos no ganho de peso de coelhos, fixando em 9,6% o incremento de peso em coelhos após seis semanas de inoculação com um probiótico constituído por bactérias *Lactobacillus acidophilus* (Amber et al., 2004). Um outro estudo utilizando *E. faecium* como probiótico, mostrou resultados muito semelhantes, ocorrendo um ganho de peso nos coelhos de 9,5% (Simonová et al., 2009). No presente estudo, os resultados não foram de encontro ao esperado, uma vez que não se obteve um peso superior nos coelhos administrados com probiótico, comparativamente ao grupo antibiótico. Porém, este resultado poderia ser melhor esclarecido se tivesse havido a possibilidade de ter instalado um grupo controlo alimentado com a mesma fórmula, mas sem probiótico e sem antibióticos no alimento.

Juntando os dados de peso e alimento consumido, verifica-se que os animais do grupo A começaram o estudo com um peso médio de 1141,7 g e acabaram com 2275,3 g, ou seja, estes coelhos aumentaram em média 1133,7 g durante as três semanas em que se encontraram no biotério, período no qual consumiram 3884,8g de alimento composto. Já os animais do grupo P iniciaram o estudo com um peso médio de 1129,0 g e acabaram com 2223,5 g, ou seja, apresentaram um incremento de peso de 1094,5 g, consumindo uma média de 3574,3 g. Assim, supondo que os animais tinham sido enviados para abate após o período de estudo, e tendo como base o custo da alimentação (Alimentação Animal Nanta S.A., Setembro 2013) e o preço de carcaça de coelho (ASPOC, Setembro 2013), poderíamos estimar o rendimento económico dos coelhos dos dois grupos, contabilizando, não o peso total, mas sim o incremento de peso. Sendo que o preço do coelho por peso vivo é 2,08 €/kg, o preço de 1 tonelada de alimento composto é 300 € e o preço da

suplementação de uma tonelada de alimento com antibióticos é cerca de 30 €, o rendimento económico por coelho no grupo A seria 1,08 € e por coelho do grupo P seria 1,20 €, ou seja, cada coelho do grupo P teria rendido mais 0,12 € do que cada coelho do grupo A. Individualmente este valor parece irrelevante, porém quando aplicado a uma grande exploração profissional constituída por 700 reprodutoras (Monteiro et al., 2013), considerando uma média de oito partos por ano com uma prolificidade de 12 láparos por parto e uma taxa de mortalidade ao desmame de 30%, obteríamos uma diferença anual de cerca de 5376 € quando utilizados probióticos na alimentação animal em substituição de antibióticos. Assim, este estudo sugere que a criação de coelhos inoculados com um probiótico parece ser mais rentável do que a criação de coelhos suplementados com antibióticos.

Ao longo do estudo verificou-se que a contagem média de *E. coli* como de *Enterococcus* spp. fecais foram superiores nos coelhos do grupo probiótico, atingindo um pico muito mais elevado que no grupo A. Este resultado seria de esperar devido à inoculação dos animais com as estirpes bacterianas constituintes do probiótico. No caso da contagem de *E. coli*, verificou-se a existência de um pico máximo muito elevado desta espécie aos 47 dias de idade nos coelhos do grupo P, ou seja, na fase final em que os coelhos apresentavam sintomas de afeção digestiva. Este facto poderá ser explicado pela diminuição das defesas dos animais. Nos coelhos do grupo probiótico verificou-se uma maior variabilidade nas contagens ao longo do tempo, observando-se picos mais abruptos que nos coelhos do grupo A. Esta diferença sugere que os antibióticos sejam mais eficazes do que os probióticos na manutenção e estabilização da microflora intestinal.

Todos os isolados de *E. coli* foram analisados relativamente ao seu filogrupo, verificando-se que tanto as estirpes constituintes do probiótico como as estirpes recolhidas ao longo do estudo pertenciam ao filogrupo B1. As estirpes de *E. coli* pertencentes aos diferentes filogrupos diferem nas suas características fenotípicas e genotípicas, parecendo ter nichos ecológicos diferentes (Gordon and Cowling, 2003; Escobar-Páramo et al., 2006). A maioria das estirpes de *E. coli* são microrganismos comensais no trato gastrointestinal, porém algumas estirpes são agentes patogénicos oportunistas e causadores de infeções intestinais e extraintestinais. Estas estirpes patogénicas estão essencialmente associadas aos filogrupos B2 e D (Boyd and Hartl, 1998; Bingen et al., 1998). Já os grupos filogenéticos

A e B1 estão mais associados às estirpes comensais (Duriez et al., 2001). Desta forma, tendo em conta que as estirpes incluídas no probiótico foram isoladas a partir de animais saudáveis, pertencendo todas a um filogrupo que agrega estirpes comensais, poderá justificar o facto de não ter sido encontrado nenhuma estirpe pertencente aos filogrupos B2 e D. Apesar de os coelhos do grupo probiótico terem apresentado diarreia durante quatro dias, o que poderia levar a pensar tratar-se de alguma estirpe patogénica, nenhuma estirpe pertencente aos filogrupos mais patogénicos foi isolada neste grupo durante este período, podendo-se assim excluir a sua presença. Estudos anteriores mostraram que, excetuando algumas estirpes difusamente aderentes e estirpes de *E. coli* enteropatogénicas, as estirpes causadoras de diarreia não se tratam de estirpes B2 (Escobar-Páramo et al., 2004; Wirth et al., 2006).

O probiótico inoculado aos coelhos tinha na sua constituição três estirpes de *E. coli* e quatro estirpes de *Enterococcus* spp., tendo quatro estirpes (ECI 1, ECI 2, EaI e EfaI) sido isoladas a partir do efetivo de onde eram oriundos os coelhos alocados a ambos os grupos, isto é, eram provenientes de coelhos adultos saudáveis da mesma exploração cunícula. Por sua vez, quer os coelhos da exploração, quer os coelhos instalados no biotério consumiram a mesma fórmula alimentar. Neste contexto, seria expectável que todas estas estirpes pudessem ser encontradas em ambos os grupos em estudo. Porém somente uma (ECI 2) destas quatro estirpes foi encontrada tanto em coelhos do grupo antibiótico como do grupo probiótico. Este facto pode ter sido a consequência do processo de seleção das estirpes para a formulação do probiótico contemplar o estudo de muitos isolados (procurando diversidade e estirpes com baixa frequência de resistências) e, como tal, ter maior sensibilidade que o método usado para obtenção de isolados a partir de amostras de fezes dos coelhos em estudo e que visava apenas selecionar seis isolados em cada amostra. Este resultado demonstra também que os cuidados higiénicos aplicados com o objetivo de evitar qualquer contaminação cruzada entre ambos os grupos tiveram eficácia.

Relativamente aos coelhos inoculados com o probiótico, foi interessante verificar a grande capacidade das estirpes inoculadas colonizarem o intestino dos coelhos. Este facto foi particularmente significativo no caso de *E. coli*, em virtude de relativamente a esta espécie ter havido apenas uma inoculação. Relativamente a estes resultados é importante manter presente que as estirpes inoculadas tiveram de competir com as previamente

existentes no intestino dos coelhos. Porém, para um total de 36 isolados obtidos a partir de amostras recolhidas no grupo probiótico, 27 (32,1%) tinham um perfil genético semelhante às estirpes inoculadas. Igualmente relevante foi constatar que as estirpes "probióticas" obtidas a partir de animais da exploração doméstica, também foram bem sucedidas na colonização do intestino dos animais inoculados. Este resultado deverá ser melhor explorado em trabalhos futuros, em virtude das estirpes isoladas em animais de produção extensiva, com uma dieta mista (alimentos compostos, fenos e vegetais verdes) e expostos a menos antimicrobianos serem colonizados por estirpes mais sensíveis e com menor probabilidade de conterem determinantes genéticos de virulência (Kudva et al., 1997). A estirpe de *E. coli* (ECD) e duas de *Enterococcus* spp. (EfaD e EfeD) recolhidas nestas condições foram encontradas apenas em coelhos do grupo probiótico, o que mostra que foram capazes de colonizar o sistema gastrointestinal dos animais, apesar de não serem encontradas em todas as recolhas. Assim, estes resultados sugerem que este é um sistema viável pois, apesar de estas estirpes serem completamente estranhas ao organismo, foram encontradas nos coelhos aos quais foram administradas, mostrando a sua capacidade de colonização. Das sete estirpes administradas no probiótico, apenas uma (a EaI – *Enterococcus aviam*) não foi detetada nas amostras fecais colhidas ao longo do estudo. No total de 56 estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas, apenas um *E. aviam* foi encontrado na amostra de fezes colhida no grupo P aos 16 dias de estudo, tratando-se, porém, de uma estirpe diferente da estirpe EaI. Atendendo a que a estirpe probiótica EaI foi isolada a partir de fezes de coelhos adultos saudáveis criados na exploração de origem dos láparos em estudo, e como tal, ser expectável uma boa adaptação ao bioma intestinal dos láparos inoculado (grupo P), a explicação poderá residir num eventual efeito de "exclusão competitiva" exercido pelas restantes estirpes incluídas no probiótico. Estudos relativos à microbiota de coelhos mostram que as espécies enterocos predominantes são *E. faecalis* (Linaje et al., 2004) e *E. faecium* (Simonová and Lauková, 2004; Simonová et al., 2005) sendo ainda encontradas - porém em menor quantidade - *E. durans* (Linaje et al., 2004; Simonová et al., 2005), *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* (Simonová and Lauková, 2004). O presente estudo vem confirmar a prevalência de *E. faecalis* na microflora de coelhos, e a presença em menor quantidade das espécies *E. faecium* e *E. gallinarum*. Este estudo sugere, ainda, que a espécie *E. aviam* não é uma espécie predominante na microflora bacteriana dos coelhos, pelo que poderá não possuir as melhores características que lhe permitam colonizar o intestino destes animais.

As estirpes EfaD e EfaI, ambas *Enterococcus faecalis*, mostraram ser 84% semelhantes geneticamente, um valor de semelhança curioso pelo facto de as duas estirpes terem sido recolhidas em explorações diferentes. A exploração da estirpe EfaI era intensiva, na qual os coelhos apenas eram alimentados com alimento composto, enquanto a exploração da estirpe EfaD se tratava de uma exploração extensiva, na qual os coelhos, para além do alimento composto, tinham uma grande diversidade de suplementos. Porém, o fornecedor de alimento composto era o mesmo para as duas explorações, pelo que o alimento poderá ter sido uma fonte epidemiológica comum. Assim, supõe-se que o alimento possa ser suficiente para disseminar *Enterococcus* spp. (Martins da Costa et al., 2007), o que explica a presença desta estirpe nas diferentes explorações.

No último dia de análise (dia 32), o dia no qual os coelhos já se encontravam misturados numa nova exploração cunícula, os animais encontravam-se com uma alimentação diferente da fornecida durante a permanência no biotério, alimentando-se, nessa altura, com uma mistura dos dois alimentos compostos (com e sem antibióticos) usados durante o ensaio e os suplementos vegetais típicos das explorações domésticas. Neste dia verificou-se que, no caso das *E. coli*, as estirpes encontradas apresentavam um perfil genético igual entre si e completamente diferente das restantes amostras isoladas ao longo do estudo. No caso dos enterococos, verificou-se que quatro dos isolados apresentavam um perfil genético semelhante entre si e a um outro isolado recolhido num dia diferente, enquanto as restantes quatro apresentavam, tal como a *E. coli*, um perfil genético diferente de todos os restantes perfis analisados. Isto demonstra que a alteração da alimentação, da fonte de água e do local, levam a alterações muito radicais da microbiota dos animais através dos seguintes mecanismos:

a) No caso da alimentação, como o alimento pode constituir um veículo de microrganismos (Martins da Costa et al., 2007), estes podem colonizar uma variada extensão do trato gastrointestinal; para além disso, como o próprio substrato nutritivo pode ser diferente, pode ocasionar o crescimento de bactérias com necessidades metabólicas distintas;
b) Relativamente ao local, a microbiota específica de cada infraestrutura pode constituir a fonte de bactérias com diferentes potenciais de colonização entérica;
c) Quanto à água, proveniente de fontes diferentes, assoma-se como um veículo muito plausível das estirpes assinaladas.

O facto de os isolados do dia 32 apresentarem um perfil completamente diferente de todos os restantes perfis encontrados, demonstra, ainda, que para que um probiótico constituído por *E. coli* ou *Enterococcus* spp. seja eficiente, terá de ser administrado continuamente, de modo a impedir que novas estirpes, provenientes de diferentes fontes, colonizem o intestino do animal.

Uma das formas utilizadas para verificar a prevalência das estirpes constituintes do probiótico ao longo do tempo foi o estudo dos perfis de resistência das amostras recolhidas, de forma a verificar se era continuo o aparecimento de estirpes com as mesmas resistências que as estirpes inoculadas no probiótico. Desta forma, observou-se o aparecimento de estirpes com perfil de resistência igual ao das estirpes do probiótico, porém com a análise por genotipagem verificou-se que, apesar da maioria das estirpes semelhantes a estirpes do probiótico possuírem o mesmo perfil de resistência das mesmas, observou-se a presença de estirpes com perfil de resistência diferentes, bem como a existência de estirpes com perfis de genotipagem diferentes e com o mesmo perfil de resistência de estirpes do probiótico. Assim, este estudo sugere que a análise dos perfis de resistência não é suficiente para tirar conclusões relativamente à semelhança entre estirpes.

Os resultados obtidos parecem sugerir benefícios no uso de probióticos em detrimento de antibióticos e, apesar do constrangimento na interpretação dos resultados subsequente à enteropatia no grupo P, esse facto permitiu colocar em evidência o fenómeno de crescimento compensatório. Porém faltou neste trabalho um terceiro grupo de coelhos de forma sincrona com os restantes grupos, para funcionar como grupo controlo, ou seja, um grupo cuja alimentação era apenas o alimento composto sem inoculação de antibiótico nem probiótico, de forma a permitir uma interpretação mais completa dos resultados. Em trabalhos futuros haverá que estudar quais as melhores formulações de probióticos, selecionando as estirpes mais capazes de colonizar, proteger os coelhos de disbacterioses intestinais, garantir um impacto, pelo menos neutro, na produtividade e, finalmente, garantir a excreção de menos fenótipos mutirresistentes.

Capítulo V:

Conclusão

A análise de resultados permitiu verificar que a inoculação de coelhos jovens com um probiótico constituído por estirpes de *E. coli* e *Enterococcus* spp. poderá ser um sistema viável na substituição de antibióticos na alimentação animal. O facto de as estirpes provenientes de uma exploração cunícula diferente da de origem dos coelhos terem sido encontradas durante os vários dias de estudo, mostra que estas foram capazes de colonizar o trato gastrointestinal dos animais. Desta forma, este estudo sugere que poderá ser possível selecionar estirpes não patogénicas e com um reduzido perfil de resistências a antibióticos para, depois, administrar a coelhos de produção, de forma a reduzir ou eliminar o número de bactérias patogénicas no sistema intestinal dos animais, aumentando os benefícios para o animal colonizado. Os resultados sugerem, ainda, que a espécie *E. aviam* não parece ter uma capacidade de colonização do biótopo semelhante a *E. faecalis* e *E. faecium*. Para que um probiótico seja eficiente e permaneça no trato gastrointestinal, os resultados apontam para que este deva ser administrado continuamente.

Em termos de performance zootécnica, o uso de probióticos parece influenciar positivamente os coelhos estudados, mostrando potencial para promover o seu crescimento. A confirmação genética da prevalência das estirpes administradas como probiótico ao longo do tempo de estudo parece mostrar que estas estirpes colonizaram os animais, pelo que os efeitos na performance zootécnica parecem estar relacionados com os benefícios do uso do probiótico em detrimento de antibiótico. Este estudo sugere ainda que o uso de probióticos poderá ser um método mais rentável na produção cunícula.

Este estudo sugere a importância da investigação na área dos probióticos, que é fundamental para a consolidação do conhecimento sobre a dinâmica da colonização intestinal por microrganismos benéficos à saúde animal e, consequentemente, à segurança sanitária dos géneros alimentícios.

Referências Bibliográficas

AMBER, K. H., YAKOUT, H. M. & HAMED RAWYA, S. Effect of feeding diets containing yucca extract or probiotic on growth, digestibility, nitrogen balance and caecal microbial activity of growing New Zealand white rabbits. Proc.: 8th World Rabbit Congress, 2004 2004 Puebla, Mexico. 737-741.

BARBOSA, T. M. & LEVY, S. B. 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates,* 3**,** 303-311.

BARRETT, T. J., LIOR, H., GREEN, J. H., KHAKHRIA, R., WELLS, J. G., BELL, B. P., GREENE, K. D., LEWIS, J. & GRIFFIN, P. M. 1994. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of Escherichia coli O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J Clin Microbiol,* 32**,** 3013-7.

BARTON, M. D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews,* 13**,** 279-299.

BENTLEY, R. & MEGANATHAN, R. 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev,* 46**,** 241-80.

BENYACOUB, J., CZARNECKI-MAULDEN, G. L., CAVADINI, C., SAUTHIER, T., ANDERSON, R. E., SCHIFFRIN, E. J. & VON DER WEID, T. 2003. Supplementation of food with Enterococcus faecium (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J Nutr,* 133**,** 1158-62.

BINGEN, E., PICARD, B., BRAHIMI, N., MATHY, S., DESJARDINS, P., ELION, J. & DENAMUR, E. 1998. Phylogenetic analysis of Escherichia coli strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis,* 177**,** 642-50.

BIRREN, B. & LAI, E. 1993. *Pulsed-Field gel electrophoresis: A practical guide.,* San Diego, Academic Press.

BOHMAN, V. R. 1955. Compensatory growth of beef cattle. The effect of hay maturity. *J. Anim. Sci.,* 14**,** 249-255.

BOSCH, T., DE NEELING, A. J., SCHOULS, L. M., VAN DER ZWALUW, K. W., KLUYTMANS, J. A., GRUNDMANN, H. & HUIJSDENS, X. W. 2010. PFGE diversity within the methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonal lineage ST398. *BMC Microbiol,* 10**,** 40.

BOYD, E. F. & HARTL, D. L. 1998. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of Escherichia coli have a phylogenetically clustered distribution. *J Bacteriol,* 180**,** 1159-65.

CARLOS, C., PIRES, M. M., STOPPE, N. C., HACHICH, E. M., SATO, M. I. Z., GOMES, T. A. T., AMARAL, L. A. & OTTOBONI, L. M. M. 2010. Escherichia coli phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *Bmc Microbiology,* 10.

CASEWELL, M., FRIIS, C., MARCO, E., MCMULLIN, P. & PHILLIPS, I. 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother,* 52**,** 159-61.

CHOCT, M. 2009. Managing gut health through nutrition. *British Poultry Science,* 50**,** 9-15.

CLERMONT, O., BONACORSI, S. & BINGEN, E. 2000. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol,* 66**,** 4555-8.

COLIN, M. & LEBAS, F. Rabbit meat production in the world. A proposal for every country. Proc. 6th World Rabbit Congress, 1996 July, Toulouse, France, 1996 1996. 323-330.

DEVRIESE, L. A., POT, B. & COLLINS, M. D. 1993. PHENOTYPIC IDENTIFICATION OF THE GENUS ENTEROCOCCUS AND DIFFERENTIATION OF PHYLOGENETICALLY DISTINCT ENTEROCOCCAL SPECIES AND SPECIES GROUPS. *Journal of Applied Bacteriology,* 75**,** 399-408.

DUNNE, W. M. & WANG, W. 1997. Clonal dissemination and colony morphotype variation of vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates in metropolitan Detroit, Michigan. *J Clin Microbiol,* 35**,** 388-92.

DURIEZ, P., CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E., CHAVENTRÉ, A., ELION, J., PICARD, B. & DENAMUR, E. 2001. Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology,* 147**,** 1671-6.

EJRNAES, K., SANDVANG, D., LUNDGREN, B., FERRY, S., HOLM, S., MONSEN, T., LUNDHOLM, R. & FRIMODT-MOLLER, N. 2006. Pulsed-field gel electrophoresis typing of Escherichia coli strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *Journal of Clinical Microbiology,* 44**,** 1776-1781.

ESCOBAR-PÁRAMO, P., CLERMONT, O., BLANC-POTARD, A. B., BUI, H., LE BOUGUÉNEC, C. & DENAMUR, E. 2004. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in Escherichia coli. *Mol Biol Evol,* 21**,** 1085-94.

ESCOBAR-PÁRAMO, P., LE MENAC'H, A., LE GALL, T., AMORIN, C., GOURIOU, S., PICARD, B., SKURNIK, D. & DENAMUR, E. 2006. Identification of forces shaping the commensal Escherichia coli genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol,* 8**,** 1975-84.

FALCAO-E-CUNHA, L., CASTRO-SOLLA, L., MAERTENS, L., MAROUNEK, M., PINHEIRO, V., FREIRE, J. & MOURAO, J. L. 2007. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: A review. *World Rabbit Science,* 15**,** 127-140.

FERNÁNDEZ-CARMONA, J., PASCUAL, J. J. & CERVERA, C. 2000. The use of fat in rabbit diets. *Proc. 7th World Rabbit Congr,* 100**,** 29-59.

FIELD, K. G. & SAMADPOUR, M. 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res,* 41**,** 3517-38.

FRANZ, C., HOLZAPFEL, W. H. & STILES, M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology,* 47**,** 1-24.

FRANZ, C. M. A. P., HUCH, M., ABRIOUEL, H., HOLZAPFEL, W. & GALVEZ, A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology,* 151**,** 125-140.

FULLER, R. 1989. PROBIOTICS IN MAN AND ANIMALS. *Journal of Applied Bacteriology,* 66**,** 365-378.

FULLER, R. 1999. Probiotics for farm animals. *Probiotics: a Critical Review***,** 15-22.

GALYEAN, M. L. & ENG, K. S. 1998. Application of research findings and summary of research needs: Bud Britton Memorial Symposium on Metabolic Disorders of Feedlot Cattle. *Journal of Animal Science,* 76**,** 323-327.

GARDINER, G., STANTON, C., LYNCH, P. B., COLLINS, J. K., FITZGERALD, G. & ROSS, R. P. 1999. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *J Dairy Sci,* 82**,** 1379-87.

GASKINS, H. R., COLLIER, C. T. & ANDERSON, D. B. 2002. Antibiotics as growth promotants: Mode of action. *Animal Biotechnology,* 13**,** 29-42.

GIDENNE, T. 1997. Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Science,* 51**,** 73-88.

GIRAFFA, G. 2002. Enterococci from foods. *Fems Microbiology Reviews,* 26**,** 163-171.

GORDON, D. M. & COWLING, A. 2003. The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology,* 149**,** 3575-86.

HARDIE, J. M. & WHILEY, R. A. 1997. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. *Journal of Applied Microbiology,* 83**,** S1-S11.

HERZER, P. J., INOUYE, S., INOUYE, M. & WHITTAM, T. S. 1990. PHYLOGENETIC DISTRIBUTION OF BRANCHED RNA-LINKED MULTICOPY SINGLE-STRANDED-DNA AMONG NATURAL ISOLATES OF ESCHERICHIA-COLI. *Journal of Bacteriology,* 172**,** 6175-6181.

HULTON, C. S., HIGGINS, C. F. & SHARP, P. M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterobacteria. *Mol Microbiol,* 5**,** 825-34.

JACKSON, C. R., FEDORKA-CRAY, P. J. & BARRETT, J. B. 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol,* 42**,** 3558-65.

JIN, L. Z., MARQUARDT, R. R. & ZHAO, X. 2000. A strain of Enterococcus faecium (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli K88 to porcine small intestine mucus. *Appl Environ Microbiol,* 66**,** 4200-4.

JOST, M. & BRACHER-JAKOB, A. 2000. Yeast products as feed additives in weaning piglets. *Agrarforschung,* 7**,** 56-61.

KUDVA, I. T., HUNT, C. W., WILLIAMS, C. J., NANCE, U. M. & HOVDE, C. J. 1997. Evaluation of dietary influences on Escherichia coli O157:H7 shedding by sheep. *Appl Environ Microbiol,* 63**,** 3878-86.

LAPLACE, J. P. 1972. LE TRANSIT DIGESTIF CHEZ LES MONOGASTRIQUES. I. — LES TECHNIQUES D'ÉTUDE. *Ann. Zootech.,* 21**,** 83-105.

LEBAS, F., COUDERT, P., ROUVIER, R. & DE ROCHAMBEAU, H. 1997. *The rabbit: husbandry, health, and production,* Food and Agriculture organization of the United Nations Rome.

LEEKHA, S., TERRELL, C. L. & EDSON, R. S. 2011. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc,* 86**,** 156-67.

LICOIS, D., WYERS, M. & COUDERT, P. 2005. Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet Res,* 36**,** 601-13.

LINAJE, R., COLOMA, M. D., PÉREZ-MARTÍNEZ, G. & ZÚÑIGA, M. 2004. Characterization of faecal enterococci from rabbits for the selection of probiotic strains. *J Appl Microbiol,* 96**,** 761-71.

MARTCHEVA, M. & LI, X.-Z. 2013. Competitive exclusion in an infection-age structured model with environmental transmission. *Journal of Mathematical Analysis and Applications,* 408**,** 225-246.

MARTINS DA COSTA, P., OLIVEIRA, M., BICA, A., VAZ-PIRES, P. & BERNARDO, F. 2007. Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. and Escherichia coli isolated from poultry feed and feed ingredients. *Vet Microbiol,* 120**,** 122-31.

MATHUR, S. & SINGH, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *International Journal of Food Microbiology,* 105**,** 281-295.

MAULE, J. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Biotechnol,* 9**,** 107-26.

MICHELAN, A. C., SCAPINELLO, C., NATALI, M. R. M., FURLAN, A. C., SAKAGUTI, E. S., FARIA, H. G., SANTOLIN, M. L. D. & HERNANDES, A. B. 2002. Utilization of probiotic, organic acid and antibiotic in diets for growing rabbits. Essay of digestibility, evaluation of intestinal morphometry and performance. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science,* 31**,** 2227-2237.

MIRAGAIA, M., COUTO, I., PEREIRA, S. F., KRISTINSSON, K. G., WESTH, H., JARLØV, J. O., CARRIÇO, J., ALMEIDA, J., SANTOS-SANCHES, I. & DE LENCASTRE, H. 2002. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis clones: evidence of geographic dissemination. *J Clin Microbiol,* 40**,** 430-8.

MONTEIRO, J. M., LINDO, I. C., ALEXANDRE, C. & ALEXANDRE, E. 2013. Estratégia para uma cunicultura sustentável. Enquadramento do setor da cunicultura - ASPOC.

MORRISON, D., WOODFORD, N. & COOKSON, B. 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology,* 83**,** S89-S99.

MOURÃO, J. L. M. 2003. *Produção de Leporídeos: O coelho em zootecnia,* Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Série Didática nº217.

MUSA, H. H., WU, S. L., ZHU, C. H., SERI, H. I. & ZHU, G. Q. 2009. The potential benefits of probiotics in animal production and health. *Journal of Animal and Veterinary Advances,* 8**,** 313-321.

NIJSTEN, R., LONDON, N., VANDENBOGAARD, A. & STOBBERINGH, E. 1993. ANTIBIOTIC-RESISTANCE OF ENTEROBACTERIACEAE ISOLATED FROM THE FECAL FLORA OF FATTENING PIGS. *Veterinary Quarterly,* 15**,** 152-156.

OLIVE, D. M. & BEAN, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol,* 37**,** 1661-9.

ORSKOV, F. & ORSKOV, I. 1992. ESCHERICHIA-COLI SEROTYPING AND DISEASE IN MAN AND ANIMALS. *Canadian Journal of Microbiology,* 38**,** 699-704.

OUWEHAND, A. C., KIRJAVAINEN, P. V., SHORTT, C. & SALMINEN, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal,* 9**,** 43-52.

PANGALLO, D., DRAHOVSKA, H., HARICHOVA, J., KARELOVA, E., CHOVANOVA, K., FERIANC, P., TURNA, J. & TIMKO, J. 2008. Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology,* 94**,** 555-562.

RASHWAN, A. A. & MARAI, I. F. M. 2000. Mortality in young rabbits: A Review. *World Rabbit Science,* 8**,** 111-124.

SALYERS, A. A., GUPTA, A. & WANG, Y. P. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology,* 12**,** 412-416.

SCHLEIFER, K. H. & KILPPERBALZ, R. 1984. TRANSFER OF STREPTOCOCCUS-FAECALIS AND STREPTOCOCCUS-FAECIUM TO THE GENUS ENTEROCOCCUS NOM REV AS ENTEROCOCCUS-FAECALIS COMB-NOV AND ENTEROCOCCUS-FAECIUM COMB-NOV. *International Journal of Systematic Bacteriology,* 34**,** 31-34.

SCHNEITZ, C. 2005. Competitive exclusion in poultry - 30 years of research. *Food Control,* 16**,** 657-667.

SCHWARTZ, D. C. & CANTOR, C. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell,* 37**,** 67-75.

SHARPLES, G. J. & LLOYD, R. G. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res,* 18**,** 6503-8.

SIMONOVÁ, M. & LAUKOVÁ, A. 2004. Isolation of faecal Enterococcus faecium strains from rabbits and their sensitivity to antibiotics and ability to bacteriocin production. *Bull Vet Inst Pulawy,* 48**,** 383-386.

SIMONOVÁ, M., LAUKOVÁ, A. & STYRIAK, I. 2005. Enterococci from rabbits - potential feed additive. *Czech Journal of Animal Science,* 50**,** 416-421.

SIMONOVÁ, M. P., LAUKOVÁ, A., CHRASTINOVA, L., STROMPFOVÁ, V., FAIX, S., VASILKOVÁ, Z., ONDRUSKA, L., JURCIK, R. & RAFAY, J. 2009. Enterococcus faecium CCM7420, bacteriocin PPB CCM7420 and their effect in the digestive tract of rabbits. *Czech J Anim Sci,* 54**,** 376-386.

SMITH, C. L. & CANTOR, C. R. 1987. Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Methods Enzymol,* 155**,** 449-67.

STACKEBRANDT, E. & TEUBER, M. 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie,* 70**,** 317-24.

TENOVER, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control,* 34**,** S3-S10.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H. & SWAMINATHAN, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol,* 33**,** 2233-9.

TOUCHON, M., HOEDE, C., TENAILLON, O., BARBE, V., BAERISWYL, S., BIDET, P., BINGEN, E., BONACORSI, S., BOUCHIER, C., BOUVET, O., CALTEAU, A., CHIAPELLO, H., CLERMONT, O., CRUVEILLER, S., DANCHIN, A., DIARD, M., DOSSAT, C., EL KAROUI, M., FRAPY, E., GARRY, L., GHIGO, J. M., GILLES, A. M., JOHNSON, J., LE BOUGUENEC, C., LESCAT, M., MANGENOT, S., MARTINEZ-JEHANNE, V., MATIC, I., NASSIF, X., OZTAS, S., PETIT, M. A., PICHON, C., ROUY, Z., SAINT RUF, C., SCHNEIDER, D., TOURRET, J., VACHERIE, B., VALLENET, D., MEDIGUE, C., ROCHA, E. P. C. & DENAMUR, E. 2009. Organised Genome Dynamics in the Escherichia coli Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *Plos Genetics,* 5.

TŮMOVÁ, E., MOVÁ, E., SKŘIVAN, M., SKŘIVANOVÁ, V. & KACEROVSKÁ, L. 2002. Effect of early feed restriction on growth in broiler chickens, turkeys and rabbits. *Czech J. Anim. Sci.,* 47**,** 418-428.

VAHJEN, W., JADAMUS, A. & SIMON, O. 2002. Influence of a probiotic Enterococcus faecium strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poults. *Archives of Animal Nutrition-Archiv Fur Tierernahrung,* 56**,** 419-429.

VALENZUELA, A. S., BENOMAR, N., ABRIOUEL, H., CAÑAMERO, M. M. & GÁLVEZ, A. 2010. Isolation and identification of Enterococcus faecium from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol,* 27**,** 955-61.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. & LUPSKI, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res,* 19**,** 6823-31.

WEI, G. F., PAN, L., DU, H. M., CHEN, J. Y. & ZHAO, L. P. 2004. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts. *Journal of Microbiological Methods,* 59**,** 91-108.

WILLEY, J. M., SHERWOOD, L. M. & WOOLVERTON, C. J. 2008. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology-7th international ed.,* New York [etc.]: McGraw-Hill Higher Education.

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,* 14**,** 207-227.

WIRTH, T., FALUSH, D., LAN, R., COLLES, F., MENSA, P., WIELER, L. H., KARCH, H., REEVES, P. R., MAIDEN, M. C., OCHMAN, H. & ACHTMAN, M. 2006. Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol,* 60**,** 1136-51.

WUNDERLICH, P. F., BRAUN, L., FUMAGALLI, I., D'APUZZO, V., HEIM, F., KARLY, M., LODI, R., POLITTA, G., VONBANK, F. & ZELTNER, L. 1989. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing Enterococcus SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J Int Med Res,* 17**,** 333-8.

XICCATO, G. & TROCINO, A. Italy, a system of integrated rabbit production. Livro de Comunicações do II Congresso Ibérico de Cunicultura, 2007 2007. 175-184.

ZIEMER, C. J. & GIBSON, G. R. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. *International Dairy Journal,* 8**,** 473-479.