

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**OLIGOELEMENTOS E DEFESAS LOCAIS:  
Influência da biodisponibilidade do zinco na  
manutenção das defesas locais na glândula mamária**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre  
em Gestão de Recursos Biológicos

Isabel Margarida de Carvalho Rosado Saianda

Évora, Dezembro de 1997

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**OLIGOELEMENTOS E DEFESAS LOCAIS:  
Influência da biodisponibilidade do zinco na  
manutenção das defesas locais na glândula mamária**



90592

Dissertação para obtenção do grau de Mestre  
em Gestão de Recursos Biológicos

Isabel Margarida de Carvalho Rosado Saianda

Évora, Dezembro de 1997

## **AGRADECIMENTOS**

Correndo embora o risco de omissão, gostaria de deixar aqui registada uma palavra de reconhecimento a todas as pessoas que, de um modo ou de outro, contribuíram para que este trabalho pudesse ser concretizado.

À minha orientadora, Senhora Professora Doutora Ana Cristina Vilela, agradeço não apenas a disponibilidade sempre demonstrada e os conhecimentos transmitidos mas também a amizade, o incentivo, a confiança e todo o apoio manifestados ao longo deste trabalho. Nos momentos de dúvida e incerteza foi, na verdade, muito mais que orientadora criteriosa: foi, principalmente, a amiga que, acreditando em mim, criticou, encorajou e fez com que o trabalho parecesse mais leve, mais agradável e mais produtivo.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, Programa PRAXIS XXI, agradeço a concessão da bolsa PRAXIS XXI/BM/6956/95 que me permitiu efectuar os trabalhos de mestrado com tranquilidade e total disponibilidade de espírito. Agradeço também o financiamento do trabalho de investigação no âmbito do projecto 3/3.3/CA/1995/95 intitulado "Mamites em ruminantes: imunidade local e seus mecanismos reguladores".

À Universidade de Évora e à Faculdade de Medicina Veterinária/ Centro Interdisciplinar de Investigação de Sanidade Animal exprimo o meu reconhecimento pelo acolhimento e pelo apoio dispensados à realização do presente trabalho.

Ao Centro de Experimentação do Baixo Alentejo - Herdade da Abóbada - na pessoa do seu director Dr. João Fialho, agradeço a

disponibilização dos recursos animais - efectivo ovino - no qual foram efectuados os ensaios necessários à consecução deste trabalho.

À Alltechaditivos - Alimentação Animal, Lda. agradeço a disponibilização dos compostos de zinco incorporados na dieta dos animais em estudo.

Ao Senhor Professor Doutor Artur Marinho, à Senhora Dr.<sup>a</sup> Cristina Queiroga e à Senhora Dr.<sup>a</sup> Eduarda Potes agradeço, para além da disponibilidade e do interesse demonstrados, os conselhos que me orientaram no início deste trabalho

Ao Senhor Professor Doutor José Manuel Martins Gonçalves, a cujos experientes conselhos, eficazes sugestões, e total disponibilidade muito fica a dever esta dissertação, quero aqui deixar o testemunho do meu reconhecimento.

Ao Senhor Professor Doutor Costa Durão agradeço os conselhos preciosos sobre técnicas histológicas.

Ao Senhor Professor Doutor António Dias Correia e ao Senhor Dr. José António Prates agradeço o apoio prestado nas técnicas de espectrofotometria.

Ao Senhor Professor Doutor Carlos Martins agradeço a ajuda e a disponibilização da centrífuga Cytospin.

Ao Senhor Professor Doutor Virgílio Almeida agradeço o auxílio prestado na análise estatística dos resultados obtidos.

Ao Senhor Professor Doutor José Henrique Duarte Correia agradeço o precioso apoio durante o decurso do trabalho.

Ao Senhor Professor Doutor Miguel Saraiva Lima agradeço a ajuda prestada.

Aos Senhores Dr. Carlos Bettencourt e Eng.º Claudino Matos agradeço a disponibilidade demonstrada e o apoio prestado.

Às Senhoras Donas Olívia, Lurdes, Helena e Rosário, da Faculdade de Medicina Veterinária, exprimo a minha gratidão pelo auxílio prestado.

À Guilhermina, à Marta, à Célia, à Esmeralda e à Paula agradeço o apoio na realização dos trabalhos de campo.

Aos funcionários da Herdade da Abóbada que cuidaram dos animais em estudo, agradeço o cuidado e o rigoroso cumprimento das condições necessárias à realização dos ensaios.

Aos meus Pais um agradecimento especial pelo incentivo e apoio que sempre me manifestaram e sem os quais não teria conseguido realizar este trabalho. Também pelo exemplo de determinação, força de vontade e pela formação humana que me transmitiram e que me têm guiado ao longo da vida.

A toda a Família agradeço o apoio e o carinho que me demonstraram e ajudaram a ultrapassar os momentos "menos fáceis".

À Tia Lucília, agradeço o acolhimento familiar e amigo que me tornou mais fácil a longa estadia em Lisboa.

À Ana Teresa e à Bisa agradeço a ajuda e, sobretudo, a amizade e o apoio constantes que, mesmo à distância, me ajudaram "a chegar ao fim".

## **DEDICATÓRIA**

**À minha Família**

# ÍNDICE

Agradecimentos.....	ii
Dedicatória .....	v
Índice .....	vi
Índice de tabelas .....	ix
Índice de figuras .....	x
Índice de gráficos .....	xi
Índice de anexos .....	xii
Índice de abreviaturas .....	xiii
1. Introdução geral.....	1
2. Possível influência do zinco nas infecções intramamárias.....	8
2.1. Introdução .....	9
2.2. Materiais e métodos.....	13
2.2.1. Caracterização do efectivo .....	13
2.2.2. Formação dos grupos .....	14
2.2.3. Detecção de mamites clínicas .....	15
2.2.4. Detecção de mamites subclínicas.....	15
2.2.5. Isolamento dos agentes etiológicos.....	16
2.2.6. Identificação dos agentes etiológicos .....	17
2.2.7. Testes de sensibilidade a antibióticos .....	17
2.3. Resultados .....	19
2.3.1. Rastreio prévio das mamites clínicas e subclínicas.....	19
2.3.2. Infecções intramamárias .....	20
2.3.3. Agentes etiológicos das mamites.....	24
2.3.4. Espectro de sensibilidade dos agentes etiológicos isolados.....	27
2.4. Discussão.....	30
3. Possível influência do zinco sobre parâmetros bioquímicos	
sanguíneos .....	36
3.1. Introdução .....	37

3.2. Materiais e métodos.....	40
3.2.1. Colheita de sangue e soro sanguíneo .....	40
3.2.2. Contagem total de células sanguíneas.....	41
3.2.3. Contagem diferencial de leucócitos .....	41
3.2.4. Análise de parâmetros bioquímicos sanguíneos .....	41
3.3. Resultados .....	42
3.3.1. Contagem total de células sanguíneas.....	42
3.3.2. Contagem diferencial de leucócitos .....	44
3.3.3. Parâmetros bioquímicos sanguíneos.....	46
3.4. Discussão.....	50
4. Possível influência do zinco na função fagocitária de neutrófilos .....	54
4.1. Introdução .....	55
4.2. Materiais e métodos.....	57
4.2.1. Animais em estudo.....	57
4.2.2. Isolamento de neutrófilos circulantes .....	57
4.2.3. Ensaio de fagocitose de partículas de latex.....	58
4.3. Resultados .....	59
4.4. Validação estatística dos resultados.....	61
4.5. Discussão.....	61
5. Possível influência do zinco na adesão bacteriana a epitélio da glândula mamária .....	66
5.1. Introdução .....	67
5.2. Materiais e métodos.....	70
5.2.1. Preparação da suspensão bacteriana .....	70
5.2.2. Obtenção de epitélio da glândula mamária .....	71
5.2.3. Ensaio de adesão .....	72
5.2.4. Ensaio de adesão a células epiteliais previamente fixadas.....	73
5.2.5. Ensaio de adesão a tecido epitelial da cisterna mamária .....	74
5.3. Resultados .....	75
5.3.1. Ensaio de adesão a células epiteliais dispersas .....	75
5.3.2. Ensaio de adesão a células epiteliais previamente fixadas.....	79
5.3.3. Ensaio de adesão a tecido epitelial da cisterna mamária .....	81



5.4. Validação estatística dos resultados.....	85
5.4.1. Ensaio de adesão a células epiteliais dispersas .....	85
5.4.2. Ensaio de adesão a células epiteliais previamente fixadas .....	86
5.4.3. Ensaio de adesão a tecido epitelial da cisterna mamária .....	87
5.5. Discussão.....	87
6. Discussão geral .....	95
Bibliografia.....	104
Anexo A. ....	113
Anexo B. ....	115
Anexo C.....	119
Anexo D .....	125
Anexo E. ....	127

# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Interpretação dos resultados do TCM, face ao aspecto da mistura. ....	15
Tabela 2- Graus de sensibilidade aos vários antibióticos, face ao diâmetro do halo de inibição de desenvolvimento bacteriano .....	19
Tabela 3 - Resultado do rastreio preliminar de mamites subclínicas, realizado em 04-03-1997. ....	19
Tabela 4 - Resultado do 1º TCM, realizado em 11-04-1997.....	21
Tabela 5 - Resultado do 2º TCM, realizado em 28-05-1997.....	22
Tabela 6 - Resultado do 4º TCM, realizado em 11-06-97.....	22
Tabela 7 - Incidência de infecções intramamárias ao longo do ensaio.....	23
Tabela 8 - Agentes etiológicos identificados nas amostras recolhidas no rastreio preliminar. ....	24
Tabela 9 - Agentes etiológicos identificados nas amostras recolhidas após o primeiro rastreio de mamites subclínicas. ....	26
Tabela 10 - Resultado dos testes de sensibilidade a antibióticos para as espécies mais representativas de <i>Staphylococci</i> .....	30
Tabela 11 - Valores dos parâmetros hematológicos dos ovinos em estudo. ....	43
Tabela 12- Valores médios dos parâmetros hematológicos para cada grupo.....	44
Tabela 13 - Fórmulas leucocitárias determinadas para cada animal amostrado. ....	46
Tabela 14 - Valores médios e respectivos desvios padrão das percentagens de leucócitos em cada grupo. ....	46
Tabela 15 - Parâmetros bioquímicos sanguíneos e ionograma.....	48
Tabela 16 - Valores médios dos parâmetros sanguíneos e do ionograma analisados para cada grupo.....	49
Tabela 17 - Resultados do ensaio de fagocitose.....	59
Tabela 18 - Resultados do ensaio de adesão a células em suspensão. ....	76
Tabela 19 - Resultados do ensaio de adesão a células em suspensão para cada grupo.....	77
Tabela 20 - Resultados do ensaio de adesão a células previamente fixadas. ....	79
Tabela 21 - Resultados do ensaio de adesão a células previamente fixadas para cada grupo.....	80
Tabela 22 - Resultados do ensaio de adesão a tecido epitelial. ....	83
Tabela 23 - Resultados do ensaio de adesão a tecido epitelial para cada grupo.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Célula epitelial com bactérias aderentes. ....	76
Figura 2 - Células epiteliais previamente fixadas com bactérias aderentes. ....	77
Figura 3 - Tecido epitelial da cisterna da glândula mamária com uma (3.a.) ou mais (3.b.) bactérias aderentes ao polo apical de células epiteliais. ....	82

# ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Incidência de infecções intramamárias observadas nos vários rastreios efectuados.....	23
Gráfico 2 - Agentes etiológicos identificados no rastreio preliminar de mamites subclínicas.....	25
Gráfico 3 - Agentes etiológicos de mamites isolados no final do ensaio.....	26
Gráfico 4 - Média dos valores de fagocitose, expressos em densidade óptica.....	60
Gráfico 5 - Adesão de <i>S. xylosus</i> a células em suspensão.....	77
Gráfico 6 - Valores médios de adesão de <i>S. xylosus</i> a células em suspensão observados em cada grupo.....	78
Gráfico 7 - Adesão de <i>S. xylosus</i> a células previamente fixadas.....	80
Gráfico 8 - Valores médios de adesão de <i>S. xylosus</i> a células previamente fixadas observados em cada grupo.....	81
Gráfico 9 - Adesão de <i>S. xylosus</i> a tecido epitelial.....	84
Gráfico 10 - Valores médios de adesão de <i>S. xylosus</i> a tecido epitelial observados em cada grupo.....	85

# ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A - Ovelhas incluídas no ensaio.mamárias observadas nos vários rastreios efectuados.....	113
Anexo B - Rastreio de mamites subclínicas. ....	115
Anexo C - Testes de sensibilidade a antibióticos. ....	119
Anexo D -Relação entre a densidade óptica e a concentração em UFC/ml de uma suspensão bacteriana.....	125
Anexo E - Resultados do ensaio de adesão bacteriana .....	127

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

11ZB	grupo de ovinos cuja dieta foi suplementada com 30ppm de zinco biodisponível e 30ppm zinco mineral
22ZM	grupo de ovinos cuja dieta foi suplementada com 60ppm zinco mineral
33CO	grupo de ovinos que não recebeu suplementação de zinco na dieta
ALKP	fosfatase alcalina
AMP	ampicilina
AS	agar sangue
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
AW	agar Wilkins-Chalgren
B	bacitracina
BAS	basófilos
BHIB	brain-heart infusion broth
BUN	ureia
CFP	cefoperazona
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CK	creatina fosfoquinase
CL	cefalexina
Cl <sup>-</sup>	ião cloro
CN	gentamicina
CREA	creatinina
CT	caldo triptose
CT	sulfato de colistina
CXM	cefuroxina
DO	densidade óptica
EOSIN	eosinófilos
FY	framicetina
GB	glóbulos brancos
GLU	glucose
GV	glóbulos vermelhos
H <sup>+</sup>	ião hidrogénio
HBSS	Hanks balanced salt solution
HCM	hemoglobina corpuscular média
HCT	hematócrito
HGB	hemoglobina
K <sup>+</sup>	ião potássio
L	Lacaune
LDH	desidrogenase láctica
LYMPH	linfócitos
MA	Merino alemão
MB	Merino branco
MC	agar MacConkey
ME	Merino espanhol
MH	agar Mueller-Hinton

MHS	agar Mueller-Hinton, com adição de 5% de sangue de ovino
MONO	monócitos
MP	Merino preto
MY	lincomicina
N	neomicina
Na <sup>+</sup>	ião sódio
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido, forma reduzida
NAGase	N-acetil-β-D-glucosaminidase
não det	não determinado
NEUTR	neutrófilos
NR	não referido
NV	novobiocina
OB	cloxacilina
OL	oleandomicina
P	penicilina
PB	polimixina B
PBS	tampão fosfato salino
PCA	plate count agar
PLT	plaquetas
PMN	neutrófilo (leucócito polimorfonuclear)
R prelim	rastreio preliminar
RD	rifampicina
S	estreptomicina
SE	sulfonamidas
SEB	Serra da Estrela branco
SEP	Serra da Estrela preto
TBIL	bilimubina total
TCM	teste californiano de mamites
TE	oxitetraciclina
TP	proteína total
TRIG	triglicéridos
UFC	unidades formadoras de colónias
V. normais	valores normais
VCM	volume corpuscular médio
W	trimetopime

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**



O termo mamite deriva do grego *masthos*, que significa mama. Classicamente, mamite é definida como uma inflamação da glândula mamária qualquer que seja a causa ou a sua origem (Jain, 1979, Radostits *et al.* 1994). Caracteriza-se pela presença de alterações físicas, químicas e frequentemente bacteriológicas do leite, associadas geralmente a modificações patológicas ao nível do tecido glandular.

As mamites são uma das doenças infecciosas com maior incidência nos animais produtores de leite, apresentando graves repercussões a nível higiossanitário e económico. Os casos de mamites clínicas são facilmente detectados, pois os animais apresentam sintomas evidentes de doença, como inflamação do úbere, diminuição ou mesmo cessação da lactação, bem como alterações na composição do leite, febre e frequentemente uma reacção sistémica (Radostits *et al.*, 1994).

Embora em muitos casos se verifiquem os sinais clássicos de inflamação: tumor, rubor, calor e dor, uma grande percentagem de glândulas mamíticas não é facilmente detectável pela palpação ou pela observação do leite, apresentado-se sob a forma de subclínica. Esta forma de infecção caracteriza-se pela ausência de sinais clínicos óbvios. Ao contrário dos bovinos, nas ovelhas a mamite clínica não parece resultar de uma evolução da forma subclínica (Bor *et al.*, 1989).

A gravidade das infecções subclínicas manifesta-se na possibilidade de contágio dos restantes animais, o que tem reflexos a nível sanitário e também a nível económico. Geralmente conduz a quebras na produtividade e alterações ao nível das características organolépticas do leite e seus derivados, objectivos, em última instância, do produtor.

Como em qualquer outra situação de doença, também em relação às mamites a prevenção constitui uma solução preferível à terapêutica.

Um maneio correcto é extremamente importante na prevenção de mamites, especialmente no que diz respeito à higiene durante a ordenha.

É importante observar uma série de medidas, tanto em termos de higiene individual da ovelha, como do próprio equipamento, no caso de a ordenha se processar de forma mecânica. A limpeza e desinfecção dos tetos antes e após a ordenha, utilizando material descartável para cada animal,

pode contribuir para uma redução da contaminação tanto dos outros animais como o equipamento. A lavagem e desinfecção do equipamento antes e após a ordenha bem como a observação de cuidados de higiene por parte dos ordenhadores são medidas tendentes a diminuir a incidência de mamites no efectivo. Uma pressão de vácuo adequada e correcta também é uma dos factores a respeitar para um correcto manuseio durante a ordenha (Dodd, 1983).

Um exame periódico do leite, com o objectivo de determinar a existência de casos subclínicos, pode minimizar o aparecimento de novas infecções. As mamites subclínicas são mais facilmente detectáveis através de testes efectuados ao leite (Radostits *et al.*, 1994). O isolamento dos animais com sinais de doença, a limpeza periódica das camas com o objectivo de controlar a microflora residente, são também medidas que podem permitir evitar a disseminação da doença no rebanho.

A vacinação é a forma de prevenção da maioria das doenças infecciosas. No entanto, trabalhos realizados para determinar a eficácia da vacinação contra agentes etiológicos de mamites em bovinos (Anderson, 1982, Colditz e Watson, 1985) mostraram que tal procedimento nem sempre conduz a resultados satisfatórios. Várias causas são apontadas, como por exemplo, a relativa escassez de elementos de defesa imunitária, os efeitos inibitórios da caseína e da gordura na eficiência fagocitária dos neutrófilos, a extensão de epitélio secretor exposto, o facto de o leite ser um excelente meio de cultura para a maioria das bactérias e ainda a variedade de microorganismos potencialmente causadores de mamite (Colditz e Watson, 1985).

Também a grande diversidade antigénica de estirpes ou toxinas de agentes patogénicos para a glândula mamária, contra os quais a vacinação deve proteger, constitui um obstáculo à imunização (Craven e Williams, 1985). Ainda o facto de as características ecológicas e edafoclimáticas diferirem entre explorações, induz uma variação na população microbiana potencialmente causadora de mamite, o que poderá contribuir para a ineficácia da vacinação.

O recurso a outras medidas de prevenção, nomeadamente através da manipulação da dieta, como a incorporação na ração de oligoelementos,

pode contribuir para a prevenção de infecções. É o caso do zinco, que se sabe desempenhar funções de protecção na glândula mamária (Kellogg 1990, Spain, 1993).

O sistema imunitário da glândula mamária cumpre duas funções: permite a imunização passiva do recém-nascido e protege o próprio organismo contra agressão por agentes patogénicos. Os mecanismos de defesa da glândula baseiam-se em componentes específicos e não específicos, existindo alguma interacção funcional entre estes componentes (Opdebeeck, 1982).

A defesa da glândula mamária contra os microorganismos invasores e potencialmente causadores de infecção intramamária compreende uma série de barreiras físicas, químicas e imunitárias. O teto é a porta de entrada para a maior parte das infecções do úbere. A sua integridade constitui a primeira linha de defesa contra os organismos invasores, sendo o revestimento de queratina uma importante barreira física e química contra a entrada de microorganismos (Bitman *et al.*, 1991). O epitélio queratinizado do canal do teto contém proteínas e lípidos bacteriostáticos, o sistema enzimático tiocianato-hidrogénio-lactoperoxidase, lactoferrina e células fagocitárias (Opdebeeck, 1982).

Verifica-se que, durante a ordenha, parte do revestimento de queratina é arrastado pela passagem do leite, ficando, por isso, o tecido epitelial mais exposto à infecção. Esse arrastamento, se bem que parcial, compromete a capacidade do canal do teto impedir a penetração de agentes patogénicos no interior da glândula mamária (Capuco *et al.*, 1992). Assim, uma rápida substituição da queratina arrastada é necessária para a prevenção da infecção, quer por agentes patogénicos, quer por microorganismos oportunistas que podem colonizar o canal do teto.

Se os microorganismos forem capazes de ultrapassar a primeira linha de defesa da glândula mamária, uma reacção inflamatória local rápida contra o agente infeccioso que penetra no teto pode impedir que a infecção se estenda a tecidos mais delicados da glândula mamária (Persson *et al.*, 1992), evitando o estabelecimento da infecção.

O zinco é necessário para o funcionamento normal de todos os sistemas vivos, desempenhando várias funções no organismo. Nos microorganismos e nos mamíferos participa na estabilização da membrana celular (Sugarman, 1983). Para além disso, o zinco funciona como activador de vários sistemas enzimáticos (McDonald *et al.*, 1988, Kellogg, 1990), fazendo parte de mais de 100 metaloenzimas que se tornam activas na sua presença (Sugarman, 1983). Por exemplo, a anidrase carbónica, a carboxipeptidase, a lactato desidrogenase, a fosfatase alcalina e a timidina quinase contêm zinco.

Este oligoelemento também tem um papel importante a nível reprodutivo, na manutenção da integridade de tecidos epiteliais, e também na síntese de colagénio (Miller *et al.*, 1967 *apud* McDowell, 1992).

Alterações no nível de zinco disponível no organismo podem influenciar o desenvolvimento de infecção, tanto por afectarem o desenvolvimento microbiano como a resposta imunitária do hospedeiro. Variações na concentração de zinco podem também afectar a bioquímica celular, devido ao seu papel a nível enzimático (Sugarman, 1983).

Estudos realizados em ratos (Chandra e Au, 1980 *apud* Spain, 1993) demonstraram que o peso do timo dos animais cujas dietas eram deficientes em zinco era inferior ao dos ratos com suplementação em zinco adequada. Tal situação deve-se a uma rápida atrofia do timo, influenciando várias funções das células T (McDowell, 1992). Também Haas *et al.* (1976) *apud* McDowell (1992) verificaram a existência de uma grave depressão da resposta de anticorpos em ratos com deficiência de zinco.

A carência de zinco afecta ainda as funções de outras células do sistema imunitário, como é o caso dos neutrófilos, as células "natural killer", para além da produção de citoquinas e fenómenos de citotoxicidade mediada por células (Hambrige *et al.*, 1986 *apud* McDowell, 1992).

As dietas comerciais contêm quantidades adequadas de zinco, embora apenas pequenas doses deste elemento pareçam estar disponíveis para o animal. O metabolismo do zinco poder ser influenciado pela interacção como outros elementos como o cálcio, o cádmio, o cobre, o ferro,

o selênio, o magnésio, bem como histidina e o nível de proteína (Strain e Pories, 1970 *apud* McDowell, 1992, Ivan e Grieve, 1975 *apud* McDowell, 1992).

Agentes quelantes naturais e sintéticos podem melhorar acentuadamente a utilização do zinco e prevenir os efeitos negativos da ligação do zinco com o ácido fítico, presente em todas as sementes de plantas e que parece interferir como a absorção intestinal (McDowell, 1992).

A absorção do zinco a nível intestinal parece ser mediada por uma molécula transportadora que provavelmente envolve a interacção com o zinco sob a forma de quelato (Solomons e Cousins, 1984 *apud* McDowell, 1992). Deste modo, a administração de uma suplementação em zinco sob a forma de quelato poderia tornar a sua absorção e consequente acção a nível do organismo mais eficiente que as formas minerais livres (Vandergrift, 1993).

Os ovinos necessitam de 9-14mg de zinco/kg de matéria seca diários segundo Chesworth (1992) ou, de acordo com NRC (1985) *apud* McDowell (1992), de 20-33mg de zinco/kg matéria seca por dia. No entanto, o stress da gravidez e da lactação alteram as necessidades deste oligoelemento. Animais em lactação com elevadas produções necessitam de uma maior quantidade de zinco na alimentação, uma vez que o leite geralmente contém 3 a 5ppm deste oligoelemento (McDowell, 1992).

Uma das características bioquímicas do zinco é a sua capacidade de se ligar a aminoácidos ou pequenas cadeias peptídicas, formando proteinatos. Estes compostos têm carga eléctrica neutra e são estáveis numa vasta gama de pH, contrariamente aos compostos minerais. Estas características permitem que os proteinatos resistam à passagem ao longo do tracto digestivo, sendo mais eficientemente absorvidos a nível intestinal que as formas inorgânicas de zinco (Vandergrift, 1993).

O zinco inorgânico, geralmente administrado sob a forma de sulfato, pode sofrer dissociação e recombinações ao longo do tubo digestivo, chegando mesmo formar compostos não absorvíveis a nível intestinal. É, nesse caso, excretado, o que pode resultar situações de carência, por um

lado, e por outro, conduzir a problemas de subaproveitamento de recurso e até de poluição ambiental.

Sabe-se que as formas biodisponíveis podem substituir, em quantidades menores, as formas inorgânicas tradicionalmente utilizadas, uma vez que a maior eficiência na absorção dos proteínatos se traduz, em termos práticos, na utilização de menores quantidades. Assim, a administração do zinco sob a forma de proteínato em vez da tradicional forma mineral pode ser importante em termos ambientais, contribuindo para uma maior rentabilização dos recursos e também para uma redução da poluição por excreção de formas inorgânicas, não absorvíveis a nível intestinal (Lowe, 1993).

O presente trabalho tem como objectivos determinar a influência da suplementação da dieta de ovelhas de vocação leiteira com zinco biodisponível sobre:

- o aparecimento de novas infecções da glândula mamária;
- a capacidade fagocitária de neutrófilos circulantes;
- a adesão bacteriana a células epiteliais da glândula mamária.

Para isso, foi analisado o efeito desta forma de administração do zinco, em comparação com uma forma mineral e também com a ausência de suplementação.

Foram ainda avaliados alguns parâmetros bioquímicos sanguíneos a fim de verificar a inexistência de sintomas de efeitos tóxico do zinco.

## **2. POSSÍVEL INFLUÊNCIA DO ZINCO NAS INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS**

## **2.1. Introdução**

A ocorrência de infecção ao nível da glândula mamária pode dever-se a diversas causas, algumas decorrentes do manejo do animal, nomeadamente a nível da higiene na ordenha, outras inerentes ao próprio animal e à sua susceptibilidade aos agentes patogénicos (Jones, 1991).

O desencadear de mamites é mais frequente na época de ordenha. O trauma que a esta pressupõe, sobretudo se for efectuada de forma mecânica, pode contribuir para o aparecimento de novas infecções. Factores como a pressão de vácuo podem provocar traumas ao nível da parede do teto, facilitando a penetração dos agentes etiológicos de mamites. Também problemas relacionados com a pulsação da máquina de ordenha podem permitir um refluxo do leite para o canal do teto, facilitando a disseminação dos microrganismos, tanto entre glândulas da mesma ovelha, como entre animais (Dodd, 1983).

Outro dos factores que pode contribuir para o aparecimento de novas infecções durante a época de ordenha reside na quebra do rolhão de queratina que preenche parcialmente o lúmen do canal do teto e inibe a penetração de microorganismos (Nickerson, 1985). Durante algum tempo após a ordenha permanece no canal uma coluna de leite residual que constitui não só uma porta de entrada para os microorganismos, como também lhes fornece um mecanismo de transporte, contribuindo para um aumento da sua susceptibilidade da glândula durante esse período (Craven e Williams, 1985).

Em caso de mamite, verifica-se uma quebra na produção de leite (Fthenakis e Jones, 1990), devido aos danos provocados pela infecção no tecido secretório (Mattila, 1985). Como consequência da infecção da glândula mamária ocorrem ainda alterações na composição do leite: aumento do número de células somáticas, alterações progressivas das concentrações iónicas, variação na concentração de proteínas como a caseína ou a seroalbumina, imunoblobulinas e ainda enzimas (Perdigon *et al.*, 1986).



A presença de substâncias produzidas pelos microorganismos responsáveis pela infecção é também responsável pela alteração das características organolépticas do leite.

A pesquisa de alterações das propriedades ou da composição do leite decorrentes da presença de infecção pode ser utilizada na detecção de mamites.

A presença no leite de enzimas como a N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase) (Saad, 1989), a  $\beta$ -galactosidase, a  $\beta$ -glucuronidase, segregadas devido a estímulos que desencadeiam a resposta inflamatória (Perdigon *et al.*, 1986), a lactato desidrogenase, a catalase ou ainda a antitripsina (Mattila, 1985) são susceptíveis de ser utilizadas como meio de determinar a presença de infecção na glândula mamária. Substâncias como a adenosina trifosfato (ATP) ou seroalbumina, resultante do aumento da permeabilidade da barreira leite-sangue, também são usadas para detectar a existência de infecção intramamária (Mattila, 1985).

A presença de células somáticas no leite é um indicador da existência de infecção do úbere (Hueston *et al.*, 1986). Em caso de infecção, verifica-se um aumento do seu número, devido principalmente a um maior afluxo de neutrófilos à glândula mamária, uma vez que estes leucócitos constituem o principal mecanismo de defesa contra a doença (Perdigon, 1985). Por este motivo a existência de mamite poderá ser detectada através da pesquisa de células somáticas no leite (Hueston *et al.*, 1986, Keisler *et al.*, 1992). Valores superiores a  $10^6$  células/ml em leite de ovelha indicam a existência de mamite subclínica (Fthenakis *et al.*, 1991), não se verificando variações devidas à forma de ordenha, isto é, os valores são semelhantes para ordenha mecânica e manual (Peris *et al.*, 1991).

A determinação do aumento do número de células somáticas, pode ser efectuada por citometria de fluxo, que permite, de forma rápida, uma contagem e caracterização individual de células em suspensão (Saad, 1989). Pode também recorrer-se à contagem diferencial ou automática das células presentes no leite (Saad, 1989) ou ao teste californiano de mamites (TCM) (Jones, 1991).

Existe uma correlação entre os resultados do TCM e as contagens de células somáticas (Philpot e Nickerson, 1991). Este teste permite, de forma rápida e expedita, detectar mamites subclínicas, por verificação do aumento do número daquelas células, fornecendo uma indicação imediata da possível presença de infecção. Foi desenvolvido por Schalm e Noorlander (1957) para a detecção de mamites em bovinos, podendo também ser utilizado em ovinos. O grau de intensidade de gelificação observado, proporcional ao número de células somáticas presentes, permite distinguir os vários graus de infecção.

Em ovinos, tal como em caprinos, a contagem de células somáticas de leite bacteriologicamente estéril é geralmente mais elevada que no leite de bovinos, apresentando bastantes variações no número de leucócitos e outras células somáticas presentes (East e Birnie, 1983, Radostits *et al.*, 1994). Valores de 700 000 a 1 milhão de células/ml, indicativos de infecção em bovinos, são frequentemente observados em leite de animais sãos. Do mesmo modo, leites pertencentes a ovelhas infectadas podem apresentar contagens de células somáticas dentro dos valores normais (inferiores a 1 milhão de células/ml) (East e Birnie, 1983), correspondendo a um estado inicial da infecção, antes de ser desencadeada a resposta inflamatória (Fthenakis e Jones, 1990 *apud* Fthenakis e Jones, 1991).

Um resultado positivo no TCM requer a realização de análises bacteriológicas ao leite, de modo a confirmar a presença de infecção. A obtenção de tal resultado, sobretudo se for o teste for realizado na fase final da lactação, poderá ser consequência da presença de células epiteliais provenientes da descamação do canal do teto ou de inflamação da glândula mamária (Perdigon, 1986). Assim, o TCM, bem como a contagem de células somáticas presentes no leite, deverão ser utilizados como testes de rastreio ou como indicadores do estado higiossanitário do efectivo, não constituir o único critério de diagnóstico de infecção intramamária (East e Birnie, 1983).

Uma das formas de prevenir o aparecimento de infecções intramamárias reside na administração de suplementos na dieta, que

actuem sobre as defesas do hospedeiro. Trabalhos em que foi testada a influência de compostos como a vitamina E e o selénio provaram que estes são eficazes na redução da incidência de mamites (Politis *et al.*, 1995).

Estudos realizados em bovinos indicam que a suplementação da dieta com zinco reduz a incidência de novas infecções, estando esta diminuição relacionada com a forma como este oligoelemento é incorporado na ração (Spain, 1993).

A utilização de minerais quimicamente ligados ou quelados a compostos orgânicos torna o elemento biologicamente mais activo que as formas minerais, uma vez que são compostos quimicamente estáveis e não interagindo com outros componentes da dieta. Para além disso, estes minerais orgânicos estão mais disponíveis para a absorção a nível intestinal.

Alguns trabalhos indiciam que a adição de zinco sob a forma de quelato diminui a contagem de células somáticas no leite aumentando a produção de leite em vacas leiteiras (Kellogg 1990, Spain, 1993).

Em ensaios experimentais em que foi testada a administração de óxido de zinco e metionina *versus* metionina de zinco a vacas em lactação, verificou--se que a suplementação da ração, com zinco ligado àquele aminoácido, reduz a contagem de células somáticas no leite, o que se reflecte na melhoria da qualidade do leite (Kellogg, 1990).

A fim de determinar o efeito da suplementação da dieta com zinco, sob as formas biodisponível e mineral, sobre o aparecimento de novas infecções, realizámos rastreios periódicos aos animais em estudo. Um rastreio preliminar destinou-se a avaliar o estado higiossanitário do efectivo, tendo sido recolhidas amostras de leite para confirmação bacteriológica do diagnóstico e identificação dos agentes etiológicos de mamites. No final do ensaio, procedemos também à recolha de amostras de leite nos casos positivos no TCM, de modo a verificar a possível existência de infecção.

Para complementar este estudo, procedemos ao estudo do espectro de sensibilidade a agentes quimioterápicos dos microorganismos isolados.

## **2.2. Materiais e métodos**

### **2.2.1. Caracterização do efectivo**

Os ensaios decorreram numa exploração cujo efectivo é formado por ovelhas de raças de aptidão leiteira - Lacaune (L), Serra da Estrela Branca (SEB) e Serra da Estrela Preta (SEP) - e por ovinos de raças rústicas Merino Branco (MB) e Merino Preto (MP), para além de Merino Espanhol (ME) e Merino Alemão (MA).

Nesta exploração, a cobrição decorre em duas épocas distintas: a primeira em Março-Abril, destina-se aos animais adultos e a segunda tem lugar em Agosto-Setembro, período em que são cobertas as malatas de substituição e eventualmente as ovelhas adultas não gestantes após a primeira cobrição.

Os borregos foram amamentados durante cerca de 70 dias, tendo as ovelhas começado a ser ordenhadas mecanicamente após o desmame.

Durante a época reprodutiva, alimentaram-se de pastagens naturais de boa qualidade, à base de trevo subterrâneo, ou semeadas, à base de aveia. Um mês antes do parto iniciou-se a suplementação alimentar com concentrado comercial e bagaço de girassol, feno de vícia e aveia e palhas de cereais. As quantidades fornecidas variaram de acordo com a aptidão dos animais:

- raças leiteiras - 500g/ animal/ dia.
- raças de aptidão mista - 300-350g/ animal/ dia.

Em geral, a suplementação manteve-se ou aumentou ligeiramente durante o período de amamentação dos borregos.

O manejo sanitário do efectivo envolveu duas intervenções, uma na Primavera e outra no Outono, destinadas a prevenir enterotoxémias e pasteureloses. Na mesma altura os animais foram desparasitados contra parasitas internos e externos. No início do Inverno, todos os animais foram ainda vacinados contra a pieira.

Sempre que foi detectada a existência de mamite, os animais foram tratados com a administração local de oxitetraciclina intramamária e dexametasona injectável.

### **2.2.2. Formação dos grupos**

Os presentes ensaios foram realizados quando o rebanho se encontrava em plena produção leiteira.

Todo o rebanho tinha sido previamente submetido a um rastreio de mamites clínicas e subclínicas, pelo que o seu estado higiossanitário era conhecido no início dos ensaios.

Seleccionaram-se 72 animais, atendendo aos seguintes critérios:

- inexistência de mamite clínica;
- presença de vários raças em cada grupo.

Foram constituídos 3 grupos constituídos por 24 ovelhas cada:

- Grupo 11 (11ZB), em cuja ração foi incorporado um suplemento de 50% de Bioplex zinco<sup>1</sup>, contendo 30ppm de zinco + 50% de zinco mineral; na dose de 60ppm;
- Grupo 22 (22ZM), cuja alimentação foi suplementada com 60ppm de zinco mineral, igualmente incorporado na ração;
- Grupo 33 (33CO), o grupo controlo, cuja ração não sofreu qualquer suplementação.

Durante 3 meses, período em que decorreu o ensaio, cada animal recebeu 700g/dia da ração testada no grupo ao qual pertencia, fornecida na sala de ordenha.

---

<sup>1</sup> Gentilmente fornecido pela Alltechaditivos - Alimentação Animal, Lda.

### 2.2.3. Detecção de mamites clínicas

As mamites clínicas foram detectadas com base na sintomatologia evidenciada pelas ovelhas e também pela alteração do aspecto do leite.

### 2.2.4. Detecção de mamites subclínicas

Mensalmente realizou-se o rastreio de mamites subclínicas nos três grupos em estudo. O rastreio preliminar foi efectuado no dia 4 de Março. Durante o decurso do ensaio foram realizados rastreios nos dias 11 de Abril, 28 de Maio e 11 de Junho.

A presença de mamites subclínicas foi detectada por meio de TCM.

O primeiro jacto de leite de cada teto foi desperdiçado, ordenhando-se os seguintes para o compartimento respectivo de uma raquete. Ajustou-se a quantidade de leite a 2ml e juntou-se igual quantidade do reagente do TCM, contendo teepol a 16%. Agitou-se a raquete com movimentos circulares e observou-se o aspecto da mistura.

A tabela 1 indica a escala de interpretação do TCM.

RESULTADO	REACÇÃO	ASPECTO DA MISTURA
N	Negativa	Sem alteração.
S	Suspeita	Ligeiro espessamento.
+	Fracamente positiva	Consistência viscosa.
++	Positiva	Formação rápida de um gel.
+++	Fortemente positiva	Consistência gelatinosa firme.

Tabela 1- Interpretação dos resultados do TCM, face ao aspecto da mistura.

### **2.2.5. Isolamento dos agentes etiológicos**

No rastreio preliminar, nos casos em que o resultado do TCM foi positivo, realizou-se a recolha asséptica de uma amostra de leite suspeito para isolamento, identificação e realização de testes de sensibilidade a antibióticos dos agentes etiológicos da mamite. Este procedimento foi repetido no final do ensaio, aquando do último rastreio efectuado.

A pele dos tetos foi desinfectada com etanol a 80%. Rejeitou-se o primeiro jacto de leite e colheu-se uma amostra com cerca de 5ml para um frasco esterilizado, observando-se rigorosamente os cuidados de assepsia. As amostras foram conservadas no frio e processadas no espaço de 3 horas.

Foi efectuada a pesquisa de bactérias aeróbias e anaeróbias presentes em cada uma das amostras colhidas.

Com o auxílio de um aro calibrado a 0,05ml, as amostras foram inoculadas por esgotamento em placas de agar sangue<sup>2</sup> (AS), com 5% de sangue de carneiro, e também de agar MacConkey<sup>3</sup> (MC). As placas foram incubadas a 37°C, durante 24 horas em atmosfera normal.

Para pesquisa de bactérias anaeróbias foram inoculadas placas de Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar<sup>4</sup> (AW) com sangue, que foram incubadas durante 48 horas, a 37°C, em atmosfera de anaerobiose.

Após a incubação, registou-se o número e o tipo de colónias presentes, tendo-se procedido igualmente ao seu isolamento por subcultura de cada colónia.

---

<sup>2</sup> Blood Agar Base Nº2, Oxoid

<sup>3</sup> MacConkey Agar Nº 3, Oxoid

<sup>4</sup> Oxoid

### 2.2.6. Identificação dos agentes etiológicos

Os agentes etiológicos foram identificados com base em características de crescimento, morfologia e metabolismo.

Considerou-se o crescimento em aerobiose (AS e MC) e anaerobiose (W). Também se utilizou como critério de identificação a morfologia das colónias e dos microorganismos por observação de preparação microscópica com ampliação de 1 000×, corada pelo método de Gram.

Foram realizados testes bioquímicos, para identificação de espécies pertencentes aos géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus*, segundo métodos tradicionais (Quinn *et al.*, 1994) e sistema API<sup>5</sup>.

### 2.2.7. Testes de sensibilidade a antibióticos

O espectro de sensibilidade aos agentes quimioterápicos das bactérias isoladas foi determinado pelo método de Kirby e Bauer descrito por Prescott *et al.*, (1996). Os fármacos testados<sup>6</sup> foram: ampicilina (AMP), bacitracina (B), cefalexina (CL), cefoperazona (CFP), cefuroxina (CXM), cloxacilina (OB), sulfato de colistina (CT), estreptomicina (S), frameticina (FY), gentamicina (CN), lincomicina (MY), neomicina (N), novobiocina (NV), oleandomicina (OL), oxitetraciclina (TE), penicilina (P), polimixina B (PB), rifampicina (RD), sulfonamidas (SE), e trimetoprima (W).

Prepararam-se suspensões bacterianas em soluto fisiológico estéril, com densidade correspondentes ao grau 0,5 na escala de MacFarland, no caso de *Staphylococci*, *Enterococci* ou *Bacilli* ou grau 2 da mesma escala, no caso de *Streptococci* e *Corynebacteria*. Placas de agar Mueller-Hinton<sup>6</sup> (MH) ou de agar Mueller-Hinton sangue<sup>7</sup> (MHS), respectivamente, foram inoculadas por inundação com cada suspensão bacteriana.

---

<sup>5</sup> bioMérieux

<sup>6</sup> Oxoid

<sup>7</sup> Muller-Hinton Agar, com adição de 5% de sangue de ovino, Oxoid



Foram colocados 7 discos de antibiótico em cada placa. Após 24 horas de incubação, a 37°C, em atmosfera normal, foi determinado o diâmetro dos halos de inibição de crescimento existentes em torno dos discos de antibiótico. A resistência ou sensibilidade das bactérias face a cada um dos fármacos testados foi determinada de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes dos discos de antibiótico, NCCD e (Quinn *et al.*, 1994), conforme se indica na tabela 2.

ANTIBIÓTICO	Resistente (Ø mm)	Intermédio (Ø mm)	Sensível (Ø mm)
Ampicilina (10 µg): Gram (-) <i>Enterobacteria</i>	≤ 13	14-16	≥ 20
<i>Staphylococci</i>	≥ 28		≥ 29
<i>Enterococci</i>	≥ 16		≥ 17
<i>Streptococci</i>	≥ 21	22-29	≥ 30
<i>Listeria monocytogenes</i>	≥ 19		≥ 20
Bacitracina (10 U)	≤ 8	9-12	≥ 13
Cefalexina (30µg)	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefoperazona (30 µg)	≤ 15	16-20	≥ 21
Cefuroxina (30µg)	≤ 14	15-17	≥ 18
Cloxacilina (5µg)	≤ 14	15-17	≥ 18
Sulfato de colistina (10µg)	≤ 8	9-10	≥ 11
Estreptomicina:			
<i>Enterococci</i> (300µg)	≤ 6	7-9	≥ 10
outros org. (10µg)	≤ 12	13-14	≥ 15
Gentamicina:			
<i>Enterococci</i> (120µg)	≤ 6	7-9	≥ 10
outros org. (10µg)	≤ 11	12-14	≥ 15
Lincomicina (2µg)	≤ 16	17-21	≥ 22
Neomicina (30µg)	≤ 12	13-16	≥ 17
Novobiocina (30µg)	≤ 17	18-21	≥ 22
Oleandomicina (15µg)	≤ 11	12-16	≥ 17
Oxitetraciclina (30µg)	≤ 14	15-18	≥ 19
Penicilina (10 U):			
<i>Staphylococci</i>	≤ 28	NR	≥ 29
<i>Enterococci</i>	≤ 14		≥ 15
Polimixina B (300 U)	≤ 8	9-11	≥ 12
Rifampicina (5µg)	≤ 16	17-19	≥ 20
Sulfonamidas (300µg)	≤ 12	13-16	≥ 17
Trimetoprima (5µg)	≤ 10	11-15	≥ 12

Tabela 2- Graus de sensibilidade aos vários antibióticos, face ao diâmetro do halo de inibição de desenvolvimento bacteriano (NR - não referido)

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Rastreio prévio das mamites clínicas e subclínicas

O rastreio preliminar, efectuado antes do início do ensaio (04-03-1997), destinou-se a avaliar o estado higiossanitário do efectivo. Num total de 209 animais rastreados registaram-se 9 casos suspeitos (6 dos quais apenas numa das glândulas mamárias e 3 em ambas), tendo 80 animais apresentado resultados positivos (39 numa das metades do úbere e 41 em ambas). Nas restantes 120 ovelhas não foi detectada mamite subclínica (tabela 3).

RESULTADO DO TCM						
	Negativo	Suspeito		Positivo		TOTAL
		1 metade	2 metades	1 metade	2 metades	
Subtotal	120	6	3	39	41	209
Percentagem	57%	3%	1%	19%	20%	100%
Total	120	9		80		209
Percentagem	57%	4%		38%		100%

Tabela 3 - Resultado do rastreio preliminar de mamites subclínicas, realizado em 04-03-1997.

Em termos percentuais, verificou-se a ocorrência de 38% de resultados positivos, 4% suspeitos e 57% de resultados negativos na pesquisa de mamites subclínicas.

## 2.3.2. Infecções intramamárias

### 2.3.2.1. Rastreios para detecção infecções intramamárias

Foram realizados 3 rastreios de mamites ao longo do ensaio, com periodicidade mensal, tendo como objectivo verificar o aparecimento de novas infecções.

A pesquisa de agentes etiológicos de mamites apenas foi efectuada no final do ensaio.

#### 2.3.2.1.1. Primeiro rastreio

No primeiro destes rastreios (11-04-1997), realizado no início do ensaio, de entre as 72 ovelhas testadas, 63 revelaram um resultado negativo no TCM. Observou-se um resultado suspeito numa das metades do úbere de 2 deles. Três ovelhas apresentaram um resultado positivo no TCM numa das glândulas mamárias, tendo 4 delas sido positivas nas duas metades do úbere.

Em termos percentuais, 88% dos animais exibiram resultados negativos, 3% suspeitos e 10% positivos.

A tabela 4 resume os resultados acima descritos.

RESULTADO DO TCM						
	Negativo	Suspeito		Positivo		TOTAL
		1 metade	2 metades	1 metade	2 metades	
Subtotal	63	2	0	3	4	72
Percentagem	88%	3%	0%	4	6%	100%
Total	63	2		7		72
Percentagem	88%	3%		10%		100%

Tabela 4 - Resultado do 1º TCM, realizado em 11-04-1997.

### 2.3.2.1.2.Segundo rastreio

Entre o primeiro e o segundo rastreios, foram excluídos dois animais do ensaio, um deles pertencente ao grupo 11ZB (ovelha 223) e o outro ao grupo 33CO (ovelha 1858).

No segundo rastreio, efectuado em 28-05-1997, observaram-se, num total de 70 animais, resultados negativos no TCM para 49 ovelhas e positivos ou suspeitos em 21 animais. Destes, 5 mostraram um resultado suspeito numa das glândulas mamárias, 10 apresentaram uma reacção positiva no TCM numa das metades do úbere e 6 nas duas metades. Num dos casos observou-se um resultado suspeito numa das glândulas e positivo na outra.

Em termos percentuais, ocorreram 70% de resultados negativos no TCM, 7% suspeitos numa das glândulas mamárias e 23% positivos, 14% dos quais numa das metades do úbere e 9% em ambas.

Os resultados deste rastreio encontram-se resumidos na tabela 5.

RESULTADO DO TCM						
	Negativo	Suspeito		Positivo		TOTAL
		1 metade	2 metades	1 metade	2 metades	
Subtotal	49	5	0	10	6	70
Percentagem	70%	7%	0%	14%	9%	100%
Total	49	7		7		72
Percentagem	70%	7%		23%		100%

Tabela 5 - Resultado do 2º TCM, realizado em 28-05-1997.

### 2.3.2.1.3.Rastreio final

No terceiro rastreio, realizado no final do ensaio (11-06-1997), num total de 70 animais, o número de casos negativos foi 62, sendo suspeitos 4

e positivos 4. Registaram-se 3 casos suspeitos numa das glândulas e 1 em ambas e 2 casos positivos em cada uma das situações.

Em termos percentuais ocorreram 89% de resultados negativos, 6% suspeitos e 6% positivos, como se observa na tabela 6.

RESULTADO DO TCM						
	Negativo	Suspeito		Positivo		TOTAL
		1 metade	2 metades	1 metade	2 metades	
Subtotal	62	3	1	2	2	70
Percentagem	89%	4%	1%	3%	3%	100%
Total	62	4		4		70
Percentagem	89%	6%		6%		100%

Tabela 6 - Resultado do 4º TCM, realizado em 11-06-97.

#### 2.3.2.2. Incidência de infecções intramamárias

A incidência de infecções intramamárias variou ao longo do ensaio e foi diferente nos vários grupos, como se pode constatar na tabela 7.

No rastreio preliminar, em que todo o efectivo ovino foi sujeito ao TCM, verificaram-se 6 casos de infecção entre as ovelhas que foram incluídas no grupo 11ZB, 7 entre as que integraram o grupo 22ZM e 5 nas que constituíram o grupo 33CO. Todos os animais infectados foram tratados pelo médico veterinário assistente da exploração.

No primeiro rastreio do ensaio, que teve lugar cerca de um mês após o rastreio preliminar, verificou-se a presença de uma ovelha com infecção intramamária no grupo 11ZB, 4 no grupo 22ZM e 3 no grupo controlo.

O segundo rastreio do ensaio realizou-se cerca de um mês depois do primeiro, tendo sido observados 6 resultados positivos no grupo 11ZB, 10 no grupo 22ZM e 4 no 33CO.

No terceiro rastreio, realizado no final do ensaio, apenas ocorreu um caso de infecção no grupo 11ZB, outro no grupo controlo (33CO) e 3 no grupo 22ZM.

Grupos	Incidência de infecções intramamárias			
	Rastreio preliminar	1º TCM	2º TCM	3º TCM
<b>11ZB</b>	6	2	6	1
<b>22ZM</b>	7	4	10	2
<b>33CO</b>	5	3	4	1

Tabela 7 - Incidência de infecções intramamárias ao longo do ensaio.

Tanto no rastreio preliminar como no final foram realizadas análises bacteriológicas destinadas a confirmar a presença de infecção.

O gráfico 1 mostra a incidência de infecções ao longo do ensaio.

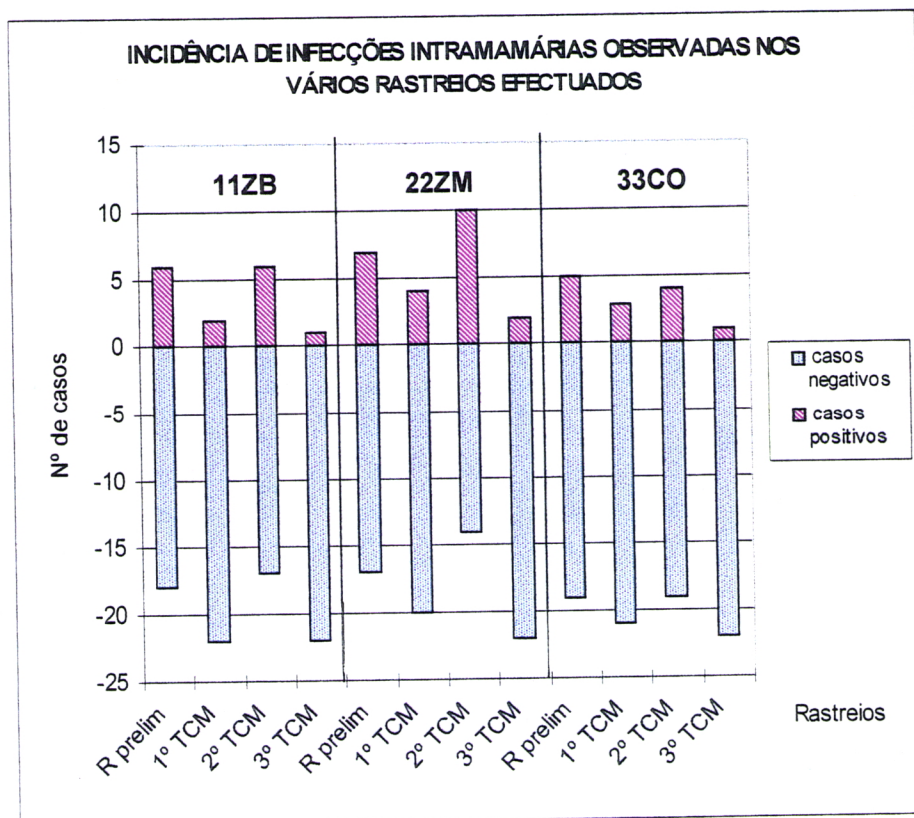


Gráfico 1 - Incidência de infecções intramamárias observadas nos vários rastreios efectuados (R prel - rastreio preliminar).

### 2.3.3. Agentes etiológicos das mamites

#### 2.3.3.1. Rastreio preliminar

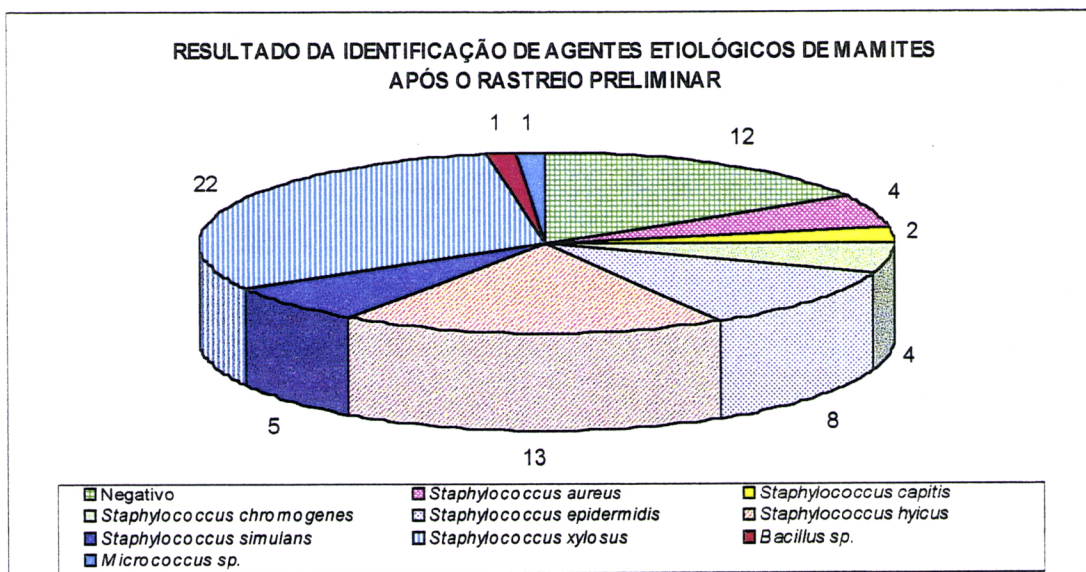
No rastreio preliminar, das 72 amostras de leite suspeito analisadas, 12 revelaram-se negativas. Nas restantes foram identificados 4 casos de infeção por *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus chromogenes*, 2 de *Staphylococcus capitis*, 8 de *Staphylococcus epidermidis*, 13 de *Staphylococcus hyicus*, 5 de *Staphylococcus simulans*, 22 de *Staphylococcus xylosus* e 1 de *Bacillus sp.* e de *Micrococcus sp.*.

A tabela 8 descreve os agentes etiológicos e o número de casos identificados a partir das amostras recolhidas para análise no rastreio preliminar.

IDENTIFICAÇÃO	
Espécie	Nº Casos
Negativo	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	4
<i>Staphylococcus capitis</i>	2
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8
<i>Staphylococcus hyicus</i>	13
<i>Staphylococcus simulans</i>	5
<i>Staphylococcus xylosus</i>	22
<i>Bacillus sp.</i>	1
<i>Micrococcus sp.</i>	1

**Tabela 8** - Agentes etiológicos identificados nas amostras recolhidas no rastreio preliminar.

O gráfico 2 representa os resultados acima descritos.



**Gráfico 2** - Agentes etiológicos identificados no rastreio preliminar de mamites subclínicas.

Seis das ovelhas a que foram recolhidas amostras de leite para a análise foram incluídas no ensaio: 213, 1958, 527, 354, 432 e 433. Em duas não foram identificados quaisquer agentes etiológicos de mamites (glândulas mamárias esquerdas das ovelhas 213, pertencente ao grupo 33CO e 527, do grupo 22ZM).

Entre os animais que foram incluídos no grupo 11ZB, ocorreram e casos de infeção por *Staphylococcus xylosum*, um na glândula mamária direita da ovelha 534 e outro na metade esquerda da 432. Verificou-se ainda a presença de infeção por *Staphylococcus hyicus* na metade direita do úbere da ovelha 433.

Ocorreu um caso de mamite subclínica devido a *Staphylococcus aureus* na metade esquerda do úbere da ovelha 1958, pertencente ao grupo 33CO, um caso de infeção por *Staphylococcus capitis* e *Micrococcus sp.* na metade direita do úbere da ovelha 527, do grupo 22ZM.



## 2.3.3.2. Rastreio final

No final do ensaio foram novamente recolhidas amostras de leite suspeito para pesquisa de agentes etiológicos de mamites. Os resultados dessas análises encontram-se resumidos na tabela 9.

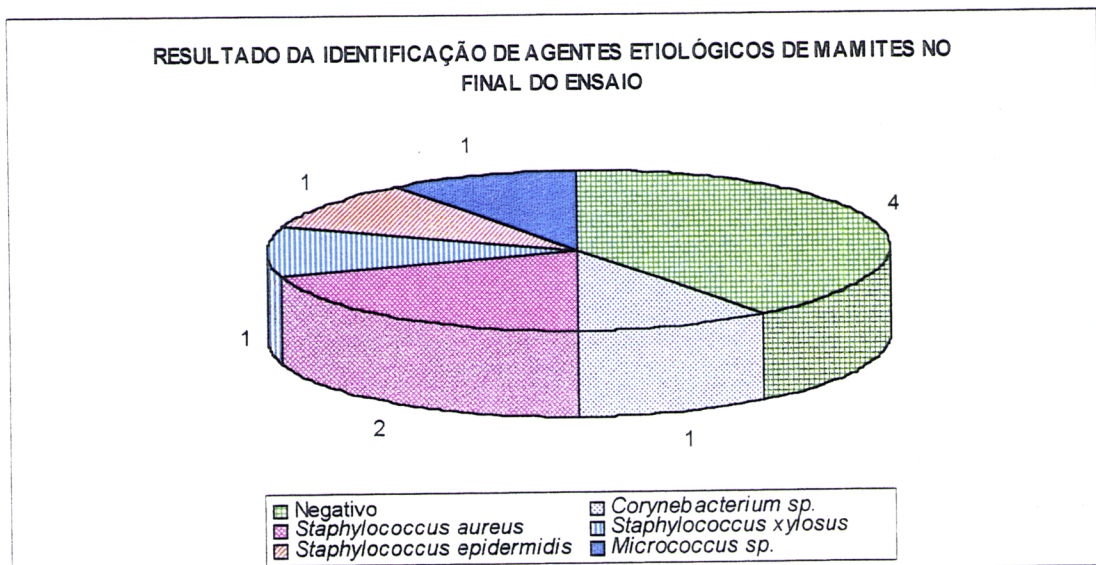
IDENTIFICAÇÃO	
Espécie	Nº Casos
Negativo	4
<i>Corynebacterium sp.</i>	1
<i>Micrococcus sp.</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1

**Tabela 9** - Agentes etiológicos identificados nas amostras recolhidas após o primeiro rastreio de mamites subclínicas.

Nestas amostras colhidas foi possível identificar 1 mamite subclínica devido a *Corynebacterium sp.*, 1 *Micrococcus sp.*, 2 de *Staphylococcus aureus*, 1 de *Staphylococcus epidermidis* e 1 de *Staphylococcus xylosus*.

Ocorreram ainda 4 resultados negativos, nas ovelhas 523 do grupo 11ZB e 309 e 465 do grupo 22ZM.

O gráfico 3 mostra os resultados acima descritos.



**Gráfico 3** - Agentes etiológicos de mamites isolados no final do ensaio.

### 2.3.4. Espectro de sensibilidade dos agentes etiológicos isolados

Os agentes etiológicos de mamites isolados na exploração em estudo foram submetidos a testes de sensibilidade a antibióticos pelo método de Kirby e Bauer (Quinn *et al.*, 1994).

A única estirpe de *Corynebacterium sp.* isolada é resistente à maioria dos antibióticos testados. Esta estirpe apenas revela sensibilidade a B, CT, S, N e SE, apresentando um resultado intermédio para OB (cf. anexo C).

As duas estirpes de *Micrococcus sp.* apresentam espectros variáveis. Os resultados são iguais para as duas estirpes no que diz respeito à sensibilidade a CFP, CT, CN, N, e PB e à resistência a W. Para os restantes antibióticos, verificou-se que uma das estirpes era resistente e outra sensível (cf. anexo C).

A espécie *Staphylococcus*, à qual pertencem 67 das estirpes isoladas nos rastreios preliminar e final, apresenta resultados variáveis nos testes de sensibilidade a antibióticos. Verifica-se que a maioria das estirpes isoladas é sensível a muitos dos antibióticos testados. Mais de 50% das estirpes, algumas com valores perto dos 100% (cf anexo C), são sensíveis a AMP, B, CL, CFP, CXM, OB, CT, S, N, NV, OL, OX, P, PB, RD, SE e W. Todas as estirpes identificadas mostraram sensibilidade à CN.

Apenas no caso da MY se verificou uma grande variabilidade, já que 48% das estirpes se revelou resistente, 31% sensível e 21% apresentou sensibilidade intermédia àquele antibiótico.

De entre os *Staphylococci* isolados, referimos apenas em pormenor os resultados de sensibilidade a antibióticos de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus* e de *Staphylococcus xylosus*, visto serem estas espécies as mais frequentemente isoladas na exploração em estudo. Estes resultados estão resumidos na tabela 10.

Todas as estirpes pertencentes a estas três espécies são sensíveis a CN e N.

As estirpes de *Staphylococcus epidermidis* apresentam resultados variáveis no que se refere a AMP, B, CL, CXM, OB, CT, S, MY, NV, OL, OX,

P, RD, SE e W. Verifica-se que mais de 60% é sensível àqueles antibióticos. No entanto, apenas cerca de metade das estirpes isoladas são sensíveis a CT, S, e W, sendo as restantes resistentes ou intermédias. Todas as estirpes são sensíveis a CFP, CN, N e PB.

Todos os *Staphylococcus hyicus* isolados são sensíveis a B, CL; CXM, OB, S, CN, N, OL, OX, PB e W. A maioria é sensível a CFP, NV, RD e SE. Verifica-se resistência de 57% das estirpes a AMP, CT, e P. 57% apresentam ainda sensibilidade intermédia a MY, sendo 21% resistentes e também 21% sensíveis a este antibiótico.

A generalidade das estirpes isoladas de *Staphylococcus xylosus* isoladas é sensível a AMP, B, CXM, CT, S, OL, OX, P, RD, SE e W. Todas as estirpes são sensíveis a CFP, CN, N e PB. Em termos de resistência, verifica-se que maior parte das estirpes isoladas não é inibida por MY e NV.

MICROORG. ANTIBIÓTICOS		<i>Staph. epidermidis</i> n=11		<i>Staph. hycus</i> n=14		<i>Staph. xylosus</i> n=25		TOTAIS n=50	
AMP	R	4	36%	8	57%	5	20%	17	34%
	I	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	S	7	64%	6	43%	20	80%	33	66%
B	R	2	18%	0	0%	1	4%	3	6%
	I	0	0%	0	0%	1	4%	1	2%
	S	9	82%	14	100%	23	92%	46	92%
CL	R	2	18%	0	0%	1	4%	3	6%
	I	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	S	9	82%	14	100%	24	96%	47	94%
CFP	R	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	I	0	0%	5	36%	0	0%	5	10%
	S	11	100%	9	64%	25	100%	45	90%
CXM	R	2	18%	0	0%	1	4%	3	6%
	I	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	S	9	82%	14	100%	24	96%	47	94%
OB	R	3	27%	0	0%	1	4%	4	8%
	I	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	S	8	73%	14	100%	24	96%	46	92%
CT	R	3	27%	8	57%	1	4%	12	24%
	I	2	18%	0	0%	2	8%	4	8%
	S	6	56%	6	43%	22	88%	34	68%
S	R	4	36%	0	0%	1	4%	5	10%
	I	2	18%	0	0%	2	8%	4	8%
	S	5	46%	14	100%	22	88%	41	82%
CN	R	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	I	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	S	11	100%	14	100%	25	100%	50	100%
MY	R	2	18%	3	21%	20	80%	25	50%
	I	3	27%	8	57%	1	4%	12	24%
	S	6	56%	3	21%	4	16%	13	26%
N	R	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	I	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	S	11	100%	14	100%	25	100%	50	100%
NV	R	2	18%	2	14%	19	76%	23	46%
	I	0	0%	1	7%	3	12%	4	8%
	S	9	82%	11	79%	3	12%	23	46%
OL	R	2	18%	0	0%	1	4%	3	6%
	I	1	9%	0	0%	0	0%	1	2%
	S	8	73%	14	100%	24	96%	46	92%
OX	R	4	36%	0	0%	8	32%	12	24%
	I	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	S	7	64%	14	100%	17	68%	38	76%
P	R	3	27%	8	57%	6	24%	17	34%
	I	1	9%	0	0%	0	0%	1	2%
	S	7	64%	6	43%	19	76%	32	64%
PB	R	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	I	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	S	11	100%	14	100%	25	100%	50	100%
RD	R	2	18%	1	7%	1	4%	4	8%
	I	1	9%	0	0%	0	0%	1	2%
	S	8	73%	13	93%	24	96%	45	90%
SE	R	4	36%	3	21%	7	28%	14	28%
	I	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	S	7	64%	11	79%	18	72%	36	72%
W	R	5	45%	0	0%	1	4%	6	12%
	I	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	S	6	55%	14	100%	24	96%	44	88%

Tabela 10 - Resultado dos testes de sensibilidade a antibióticos para as espécies mais representativas de *Staphylococci*.

## **2.4. Discussão**

A formação dos grupos incluídos no ensaio foi feita de acordo com os seguintes critérios: inexistência de mamites clínicas e inclusão de animais de todas as raças presentes no rebanho em cada grupo.

Dos 209 animais que compunham o rebanho, foram seleccionados 72 que se dividiram em 3 grupos de 24. A um deles, 11ZB, foi fornecida ração na qual foi incorporado um suplemento de 50% de Bioplex zinco (30ppm) e 50% de zinco mineral (30ppm). O segundo, 22ZM, recebeu alimentação suplementada com zinco mineral (60ppm), igualmente incorporado na ração e o terceiro, 33CO, funcionou como controlo, não tendo, por isso, a sua ração sofrido qualquer suplementação em zinco.

Estudos de campo realizados em bovinos revelaram melhores resultados com a utilização de proteínatos como forma de administração de suplemento minerais face à suplementação com os mesmos níveis de formas inorgânicas (Vandergrift, 1993). Para além disso, a introdução na ração de uma percentagem de zinco sob a forma quelada permite reduzir a quantidade diária necessária, quando comparada com a forma inorgânica (Lowe, 1993). Outra das vantagens da associação do zinco mineral ao proteínato de zinco é a acentuada redução dos custos, tornando--os suportáveis por explorações com intuítos comerciais. Por estes motivos, nenhum grupo recebeu apenas zinco biodisponível como suplementação.

Assim, no grupo em que se testou a possível influência do zinco biodisponível no aparecimento de novas infecções intramamárias, foi incorporada na ração uma dose de zinco constituída por 50% de Bioplex zinco e 50% de sulfato de zinco.

Para a avaliação do estado sanitário do efectivo antes do início do ensaio foi realizado um rastreio de mamites subclínicas, com base no TCM. O rastreio foi repetido mensalmente ao longo do ensaio.

O diagnóstico definitivo de mamites subclínicas dever assentar nos resultados das culturas bacteriológicas (East e Birnie, 1983), uma vez que uma contagem de células somáticas elevada, por si só, nem sempre é indicação de mamite infecciosa (Anderson, 1982). Por isso, no rastreio prévio e no final do ensaio foram recolhidas amostras de leite para análise bacteriológica aos animais que revelaram um resultado positivo no TCM.

A pesquisa de bactérias aeróbias e anaeróbias em leites suspeitos ou positivos no TCM, revelou que alguns dos animais com resultado positivo naquele teste na realidade não se encontravam infectados. Pode, no entanto, ter havido infecção por agentes não pesquisados, como *Mycoplasma sp.*, fungos ou infecção viral subjacente.

Também é de considerar a possibilidade de existência de mamites subclínicas não detectadas pelo TCM, dado que este apenas permite identificar 62% de infecção devidas a *Staphylococci* coagulase-positivos (Hueston *et al.*, 1986). Como a maior parte dos microorganismos por nós isolados (cf. tabelas 8 e 9) pertence a este último grupo, temos sempre que considerar a possibilidade de existência de falsos-negativos no TCM.

No rastreio prévio realizado para determinar o estado higiossanitário do efectivo, em 12 casos com resultado positivo no TCM, não se detectou infecção. Desses animais 6 pertenciam aos grupos em estudo.

No final do ensaio, dos resultados positivos no TCM, 4 revelaram-se negativos após a realização das análises laboratoriais destinadas a identificar os agentes etiológicos de mamites. Tal facto pode resultar de este rastreio ter sido realizado no final do período de lactação das ovelhas. Nessa altura verifica-se uma maior descamação do epitélio da glândula mamária, com o conseqüente aumento da quantidade de células presentes no leite (Nickerson, 1985), cuja lise contribui para a gelificação da mistura.

O número de infecções no final do ensaio é muito baixo em todos os grupos - 1 infecção nos grupos 11ZB e 33CO e 2 no 22ZM -, e as diferenças entre os grupos não têm significado, pelo que nada podemos concluir sobre

a influência da suplementação da dieta com zinco no estabelecimento de novas infecções.

Para a baixa incidência de mamites no efectivo pode contribuir o respeito pelas regras básicas de manejo, tanto geral como durante a ordenha, praticado na exploração em estudo. Em trabalhos realizados noutros efectivos, onde não são observados os cuidados necessários de higiene na ordenha, Queiroga *et al.* (1997) obtiveram taxas de incidência de mamites subclínicas, determinada através da realização do TCM, de 92,5% num dos efectivos estudados e 70,1% noutro.

Os casos de mamites detectados foram tratados de imediato com oxitetraciclina, facto que pode também ter contribuído para a fraca incidência de mamites, uma vez que a maioria das estirpes de *Staphylococci* isoladas na exploração mostrou sensibilidade a este fármaco. Deste modo, o tratamento dos animais infectados pode ter contribuído para a redução do contágio a outros animais.

No rastreio preliminar, efectuado antes do início do ensaio, verificou-se que a maior parte dos agentes etiológicos de mamites identificados eram *Staphylococci* coagulase-negativos, sendo as espécies *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus epidermidis* as mais representativas. De entre as ovelhas que foram incluídas no ensaio, 4 encontravam-se infectadas: duas com *Staphylococcus xylosus*, uma com *Staphylococcus hyicus*, uma com *Staphylococcus aureus* e finalmente um caso de infecção mista por *Staphylococcus capitis* e *Micrococcus sp.*

No rastreio final, foram recolhidas 10 amostras para análise, tendo sido identificadas espécies já isoladas no rastreio preliminar e ainda um caso de mamite subclínica devida a *Corynebacterium sp.*

Os resultados da identificação de agentes etiológicos de mamites na exploração em estudo sugerem que existe uma microflora persistente no local, uma vez que se registam infecções devidas ao mesmo agente etiológico em alturas diferentes do ensaio.

De acordo com a literatura, os principais agentes etiológicos de mamites em ovelhas são espécies de *Pasteurella* e de *Staphylococci*, principalmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* (Radostits *et al.*, 1994) ou ainda, *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus spp.* (East e Birnie, 1983). Está também descrito que o *Staphylococcus aureus*, a *Pasteurella haemolytica* ou ainda o *Micrococcus sp.* são importantes agentes etiológicos de mamites subclínicas (East e Birnie, 1983, Watson *et al.*, 1990, Jones, 1991).

Num trabalho sobre a relação entre a infecção intramamária subclínica e a mamite clínica em ovelhas em lactação, Bor *et al.* (1989) verificaram o *Micrococcus spp.*, era a bactéria mais frequentemente isolada, seguida de *Staphylococci* coagulase-negativos. Estes resultados, se bem que concordantes com os nossos em termos de géneros isolados, divergem no que se refere à predominância, visto termos isolado principalmente estirpes de *Staphylococci* e apenas uma estirpe de *Micrococcus sp.*, em cada recolha de amostras de leite efectuada.

Um estudo de campo sobre as mamites subclínicas no sul da Inglaterra revelou que as bactérias predominantes eram *Streptococci* (42%), *Staphylococci* coagulase-negativos (33%), *Pasteurella haemolytica* (17%) e *Staphylococcus aureus* (8%) (Watkins *et al.*, 1991). Destas, apenas encontrámos na nossa pesquisa *Staphylococci* coagulase-negativos e *Staphylococcus aureus*.

Numa pesquisa levada a cabo em Inglaterra sobre casos de mamite clínica aguda, subclínica e crónica em ovinos, Fthenakis *et al.* (1994) isolaram *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus hyicus* de casos de mamite subclínica. Estas espécies também foram por nós isoladas nas amostras de leite recolhidas nos grupos do ensaio.

Também em Portugal os *Staphylococci* coagulase-negativos constituem importantes agentes de mamites em ovinos.) A espécie mais frequentemente isolada por Queiroga *et al.* (1997) foi *Staphylococcus*



*epidermidis*, seguida do *Staphylococcus hyicus*, espécies também por nós isoladas. Naquelas explorações foram ainda isolados microorganismos pertencentes aos géneros *Streptococci*, *Enterococci*, *Pseudomonas* ou ainda *Actinomyces*, que não encontramos no efectivo em estudo.

A divergência entre o nosso trabalho e o estudo de Queiroga *et al.* (1997) pode dever-se ao facto de terem sido realizados em regiões diferentes, com características edafoclimáticas diversas, conducentes, por isso, à presença de microfloras próprias. Pode ainda ser o resultado de diferenças no maneio, que poderão ter sido responsáveis por condições mais favoráveis ao desenvolvimento de certas espécies microbianas em detrimento de outras.

O método por nós utilizado para a determinação do espectro de sensibilidade a antibióticos dos agentes etiológicos isolados baseou-se inibição do seu crescimento em torno de discos impregnados com os fármacos colocados em placas inoculadas com suspensões bacterianas. Verificou-se que a maioria das estirpes de *Staphylococci* é sensível à oxitetraciclina, fármaco utilizado na exploração para o tratamento de mamites. No entanto, os outros dois géneros isolados - *Corynebacteria* e *Micococci*, se bem que pouco representativos, apresentam resistência àquele agente quimioterápico.

O facto de se obterem resultados de sensibilidade diferente para estirpes da mesma espécie (cf. anexo C), como por exemplo o *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus hyicus* poderá ser o resultado de desenvolvimento de resistência e pressão de selecção, contribuindo para a sua prevalência como agentes etiológicos de mamites no efectivo.

Também Fthenakis *et al.* (1994) testaram a sensibilidade de *Staphylococci* coagulase-negativos a vários antibióticos, tendo encontrado espectros de sensibilidade diferentes na mesma espécie bacteriana. Os nossos resultados divergem dos destes autores no que respeita à

sensibilidade do *Staphylococcus xylosus* à penicilina. Nas estirpes por nós isoladas verificou-se que 76% eram resistentes àquele fármaco (cf. anexo C) enquanto que naquele estudo todas as estirpes isolada apresentavam resistência.

Em relação às espécies bacterianas menos frequentes, os resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos não podem ser considerados representativos devido à pequena amostragem.

Em trabalhos futuros será importante avaliar a importância da suplementação da dieta com zinco no aparecimento de infecções intramamárias noutros tipos de exploração, onde se verifiquem maiores taxas de incidência de mamites. Terá particular interesse realizar os estudos em efectivos sujeitos a cuidados de menos rigorosos que os praticados na exploração onde realizámos o presente trabalho.

### **3. POSSÍVEL INFLUÊNCIA DO ZINCO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS**

### 3.1. **Introdução**

O zinco desempenha várias funções no organismo. Intervém em vários sistemas enzimáticos, como componente intrínseco da molécula ou como factor necessário para a sua actividade. Está também envolvido nas sínteses proteica e de ácidos nucleicos e no metabolismo de hidratos de carbono e lípidos (Miller, 1970, Hungerford, 1990, McDowell, 1992). A fosfatase alcalina, por exemplo, tem geralmente na sua composição zinco (Faila, 1977 *apud* Sugarman, 1983, Trotman e Greenwood, 1971 *apud* Sugarman, 1983). Também a carboxipeptidase e a desidrogenase láctica contêm zinco na sua composição (Ferrando, 1964, MacDonald, 1988).

A acção deste metal faz-se ainda sentir na permeabilidade da membrana celular e do funcionamento da bomba de sódio (McDowell, 1992).

Este oligoelemento também actua a nível hormonal. Vários estudos indicam que se verifica a hipertrofia da adrenal em ratos e suínos quando existe carência de zinco como também ter efeitos a nível reprodutivo e de fertilidade, tanto em fêmeas como em machos (Miller, 1970, McDowell, 1992). Foi demonstrado que a carência de zinco se reflecte na síntese de corticosteróides e de insulina. Em caso de carência de zinco, a adrenocorticotrofina não estimula a síntese de corticosteróides, o que sugere que aquela hormona funciona na sua dependência (Flynn *et al.*, 1972 *apud* McDowell, 1992).

O zinco contribui igualmente para a manutenção das concentrações de vitamina A a nível do plasma e é necessário para o normal funcionamento do epitélio do ovário (Smith *et al.*, 1973 *apud* McDowell, 1992, Chhabra e Arora, 1985 *apud* McDowell, 1992).

O efeito do zinco ainda se faz sentir a nível da integridade cutânea, da produção de lã e de pelo, devido ao seu papel na síntese de ácidos nucleicos e do colagénio da pele (Miller *et al.*, 1979 *apud* McDowell, 1992).

Tanto a carência como o excesso de zinco provocam alterações na integridade funcional do organismo.

Em ovinos a carência de zinco pode conduzir à perda de lã e a manifestações cutâneas, como a paraqueratose (Hungerford, 1990) e dificuldade nos processos de cicatrização, assim como à perda de apetite (Suttle e Jones, 1989).

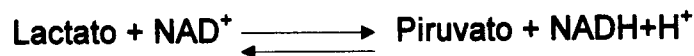
O excesso de zinco produz sintomas gerais de intoxicação por metais, como sejam anorexia, mal estar geral, vômitos violentos, diarreia, dor abdominal e colapso. Alguns animais mostram-se sonolentos e apresentam parésia (MacDonald, 1988, Humphreys, 1990).

A intoxicação por zinco surge mais frequentemente em animais cuja dieta é suplementada com sulfato de zinco (Hungerford, 1990). Segundo Humphreys (1990) e MacDonald (1988), o zinco induz a diminuição da assimilação de cobre e também alta incidência de abortos nados-mortos em ovinos.

Uma das formas para verificar a possível influência do zinco a nível do organismo é a análise quantitativa de enzimas, nomeadamente das relacionadas com a função hepática: fosfatase alcalina, desidrogenase láctica e aspartato aminotransferase.

A fosfatase alcalina participa na hidrólise de monoésteres de fosfato em pH alcalino. Esta enzima é também importante para o transporte da glucose, estando presente em todas as células do organismo cuja fonte de energia é aquele açúcar (Benjamin, 1984).

A desidrogenase láctica está presente em todos os tecidos que utilizam a glucose como fonte de energia. Cataliza a seguinte reacção:



(NAD<sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleótido, oxidada; NADH - nicotinamida adenina dinucleótido, reduzida, H<sup>+</sup> - ião hidrogénio)

A aspartato aminotransferase, anteriormente conhecida como transaminase glutâmica oxaloacética, é uma enzima que cataliza a transferência de grupos  $\alpha$ -amina do ácido aspártico para ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, resultando desta reacção a formação, respectivamente, dos ácidos oxaloacético e glutâmico. Esta enzima encontra-se nas mitocôndrias

e no citoplasma de todas as células o organismo (Benjamin, 1984), sobretudo no músculo esquelético e cardíaco (Coles, 1979).

A análise dos pigmentos biliares também permite inferir sobre a função hepática. A bilirrubina é um pigmento biliar derivado do catabolismo da hemoglobina libertada por hemocaterese, conferindo a cor amarela ao soro (Benjamin, 1984).

O teor de proteínas no soro, observado através da quantificação das proteínas totais, está relacionado com a função hepática, uma vez que é a nível do fígado que são sintetizadas proteínas como a albumina, a maior parte das globulinas, assim como lipoproteínas, glucoproteínas, mucoproteínas, fibrinogénio, protrombina e factores de coagulação (Benjamin, 1984). As anomalias a nível das proteínas plasmáticas revelam a ocorrência de alteração nos tecidos responsáveis pelo balanço entre a síntese proteica e o catabolismo, não sendo indicadoras de uma patologia específica (Coles, 1979, Dimopoulos, 1970 *apud* Benjamin, 1984).

Outros compostos presentes no sangue, como por exemplo, glucose, triglicéridos, creatina fosfoquinase, creatinina e ureia, também podem ser utilizados como indicadores da possível influência do zinco no funcionamento do organismo.

A creatina fosfoquinase é uma transferase que se encontra presente nos músculos cardíaco e esquelético e no cérebro, mas não no fígado (Benjamin, 1984). A creatinina é um composto nitrogenado não proteico presente no soro sanguíneo, resultante da metabolismo muscular da creatina e da fosfocreatina (Coles, 1979).

A ureia é o principal resíduo do catabolismo proteico no fígado (Coles, 1979), sendo um indicador muito sensível de lesões a nível hepático (Benjamin, 1984).

Dado que o zinco está relacionado com o funcionamento da bomba de sódio-potássio, é possível analisar o efeito da administração deste oligoelemento na dieta das ovelhas, a nível dos principais electrólitos

presentes no soro, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e K<sup>+</sup>, embora este último se encontre presente em pequena quantidade no plasma sanguíneo (Benjamin, 1984).

Investigou-se também a possível influência do zinco sobre a fracção celular do sangue e ainda sobre índices reprodutivos.

Para verificar a influência da suplementação da dieta com zinco sobre parâmetros bioquímicos, foram analisadas amostras de sangue de:

- animais cuja ração foi suplementada com zinco biodisponível e mineral (grupo 11ZB);
- animais cuja ração foi suplementada apenas com zinco mineral (grupo 22ZM);
- animais que não receberam qualquer suplementação daquele oligoelemento (grupo 33CO).

(cf Cap2, 2.2.2.)

## **3.2. Materiais e métodos**

### **3.2.1. Colheita de sangue e soro sanguíneo**

Foi feita a recolha de amostras de sangue a 12 animais de cada grupo, seleccionados de forma aleatória.

Colheram-se amostras de 2,5ml de sangue da veia jugular de cada ovelha para um tubo contendo EDTA<sup>8</sup> e de 10ml para outro sem qualquer anticoagulante<sup>9</sup>, de forma a obter o soro necessário às análises.

---

<sup>8</sup> Venoject II EDTA, Terumo Europe N. V., Belgium

<sup>9</sup> Venoject Plain non silicone coated Z, Terumo Europe N. V., Belgium

### **3.2.2. Contagem total de células sanguíneas**

A contagem total de células sanguíneas foi realizada num contador de células Baker System 9120 +CP<sup>10</sup>, Biochem ImmunoSystems, a partir do sangue colhido para o tubo contendo EDTA.

### **3.2.3. Contagem diferencial de leucócitos**

Prepararam-se esfregaços de sangue, corados pelo método de Giemsa, para realizar a contagem diferencial dos leucócitos, feita com o auxílio de um microscópio óptico, com objectiva de imersão e ampliação de 1 000 x.

Foram contadas de forma aleatória 100 células em cada esfregaço.

### **3.2.4. Análise de parâmetros bioquímicos sanguíneos**

A análise dos parâmetros bioquímicos sanguíneos foi realizada colorimetricamente por método de química seca com o auxílio do VetTest<sup>11</sup>.

Estudaram-se as alterações enzimáticas relacionadas com a função hepática: fosfatase alcalina (ALKP), desidrogenase láctica (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubina total (TBIL). Foram também analisados os níveis séricos de triglicéridos (TRIG), de proteínas totais (TP), de glucose (GLU), de creatina fosfoquinase (CK), de creatinina (CREA) e de ureia (BUN).

Foi ainda realizado o ionograma<sup>12</sup>, tendo sido determinados os níveis sanguíneos de cloro (Cl<sup>-</sup>), sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>).

---

<sup>10</sup> Menarini Diagnostics, Lda, gentilmente cedido pelo Sr. Raul Vances

<sup>11</sup> Idex

<sup>12</sup> VetLyte Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup> Analyser



### **3.3. Resultados**

#### **3.3.1. Contagem total de células sanguíneas**

O estudo hematológico forneceu-nos os valores de glóbulos brancos (GB), glóbulos vermelhos (GV), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e plaquetas (PLT).

Os resultados da contagem de células sanguíneas foram comparados com os valores normais indicados para ovinos (Jain *et al.*, 1993) e encontram-se registados na tabela 11.

As contagens de células sanguíneas encontradas para os animais amostrados dentro de cada grupo estão, na maioria dos casos, dentro dos valores normais para a espécie ovina.

No grupo 11ZB, a ovelha 004 apresenta valores de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas bastante abaixo do normal. Ainda no mesmo grupo, a 302 apresenta um valor de leucócitos bastante acima do normal para a espécie.

Os valores de glóbulos vermelhos estão um ligeiramente abaixo do valor máximo considerado normal nas ovelhas 309, 364, 491, 509, 530 e 2004 do grupo 22ZM e 526 do grupo controlo.

As ovelhas 364 e 509, pertencentes ao grupo 22ZB, apresentam valores de hemoglobina e hematócrito abaixo dos mínimos considerados normais para a espécie ovina.

Os valores de VCM e HCM são superiores ao máximo considerado normal na ovelha 509.

A concentração média de hemoglobina corpuscular encontra-se ligeiramente abaixo dos valores normais para a maioria dos animais, estando dentro dos parâmetros normais nas ovelhas 203, 303, 432 e 915 do grupo 11ZB, 003, 364, 491, 509 e 530 e 2004 do grupo 22ZM e todas as do grupo 33CO, excepto os animais nº 425 e 429.

Identificação do animal	Células		GB	GV	HGB	HCT	VCM	HCM	HCMC	PLT
	Nº	Raça	x10 <sup>9</sup> /l	x10 <sup>12</sup> /l	g/dl	%	fl	pg	%	x10 <sup>9</sup> /l
Grupo	V. normais		4-12	9-15	9-15	27-45	28-40	8-12	31-34	250-750
11ZB	004	MB	1,3	1,93	2,0	6,6	34,3	10,4	30,3	118,0
	203	SEB	7,8	10,52	11,7	37,8	35,9	11,1	31,0	544,0
	302	SEP	26,1	10,59	11,4	38,0	35,9	10,8	30,0	396,0
	303	SEB	6,2	9,52	11,0	35,5	37,3	11,6	31,0	214,0
	311	MB	9,2	10,11	10,7	36,0	35,6	10,6	29,7	393,0
	329	MB	6,5	10,93	11,4	38,0	34,8	10,4	30,0	401,0
	432	L	7,6	10,08	11,0	34,6	34,3	10,9	31,8	343,0
	502	L	10,0	8,55	10,0	32,8	38,4	11,7	30,5	362,0
22ZM	915	MB	4,9	9,18	10,3	32,5	35,4	11,2	31,7	323,0
	033	MB	5,4	11,11	11,7	36,6	32,9	10,5	32,0	262,0
	309	MB	5,8	8,07	10,1	33,1	41,0	12,5	30,5	204,0
	364	L	8,6	7,53	8,5	25,9	34,4	11,3	32,8	351,0
	402	SEB	6,8	10,61	11,8	39,5	37,2	11,1	29,9	397,0
	491	MB	5,4	8,53	10,8	32,8	38,5	12,7	32,9	190,0
	509	L	5,5	5,16	7,4	24,3	47,0	14,3	30,5	200,0
	527	SEB	6,4	9,56	10,1	35,3	36,9	10,6	28,6	512,0
33CO	530	SEB	6,2	8,91	10,3	32,8	36,8	11,6	31,4	234,0
	2004	MB	6,4	8,12	10,1	32,6	40,2	12,4	31,0	357,0
	303	SEP	6,2	10,87	11,3	38,6	35,5	10,4	29,3	195,0
	304	SEB	7,3	10,57	11,2	37,3	35,3	10,6	30,0	176,0
	425	L	4,9	7,92	8,5	27,2	34,3	10,7	31,3	489,0
	429	L	7,4	8,62	10,3	32,5	37,7	11,9	31,7	232,0
	517	SEP	7,8	10,57	10,6	37,6	35,6	10,0	28,2	145,0
	522	L	8,9	9,83	10,7	35,6	36,2	10,9	30,1	480,0
33CO	526	SEB	9,6	8,36	8,9	28,8	34,5	10,6	30,9	736,0
	1158	MB	5,9	11,19	12,6	42,6	38,1	11,3	29,6	256,0

Tabela 1 - Valores dos parâmetros hematológicos dos ovinos em estudo.

Algumas ovelhas apresentam valores de plaquetas abaixo do normal: 004 e 303 do grupo 11Z, 309, 491, 509 e 530 do grupo 22ZM e 303, 304, 429 e 517 do grupo 33CO.

Em termos médios, verifica-se que os valores encontrados nas contagem de células sanguíneas se encontram dentro dos parâmetros normais para a espécie ovina em todos os grupos (tabela 12), excepto no caso da concentração média de hemoglobina corpuscular, que está ligeiramente abaixo do normal nos grupos 11ZB e 33CO.

Grupos	Células V. normais	GB	GV	HGB	HCT	VCM	HCM	CHCM	PLT
		x10 <sup>9</sup> /l	x10 <sup>12</sup> /l	g/dl	%	f	pg	%	x10 <sup>9</sup> /l
		4-12	9-15	9-15	27-45	28-40	8-12	31-34	250-750
11ZM	MÉDIA	8,8	9,0	9,9	32,4	35,8	11,0	30,7	343,8
	DES. PADRÃO	7,0	2,8	3,0	9,9	1,4	0,5	0,8	121,0
22ZM	MÉDIA	6,3	8,7	10,1	32,5	38,0	11,8	31,1	312,9
	DES. PADRÃO	1,1	1,9	1,5	5,1	4,3	1,3	1,5	111,3
33CO	MÉDIA	7,3	9,7	10,5	35,0	35,9	10,8	30,1	338,6
	DES. PADRÃO	1,6	1,3	1,3	5,2	1,4	0,6	1,1	208,1

Tabela 12- Valores médios dos parâmetros hematológicos para cada grupo (V. normais - valores normais).

### 3.3.2. Contagem diferencial de leucócitos

Foram contados 100 glóbulos brancos em cada esfregaço efectuado, tendo sido determinadas as fórmulas leucocitárias encontradas para cada animal (tabela 13). Os valores normais utilizados são os indicados para ovinos (Jain *et al.*, 1993).

A generalidade dos animais apresenta fórmulas leucocitárias correspondentes às percentagens normais para a espécie.

Foram encontradas percentagens de eosinófilos ligeiramente superiores ao normal nas ovelhas 302, 311, 432, 502 e 504 do grupo 11ZB, 364, 473 e 2004 do grupo 22ZM e 213, 303, 429 e 508 do grupo controlo.

Para as ovelhas 527 do grupo 22ZM e 425 do grupo 33CO foram encontradas percentagens de neutrófilos ligeiramente superiores ao máximo considerado normal para ovinos.

Identificação do Grupo		Leucócitos		BAS	EOSIN	NEUTR	LYMPH	MONO	TOTAL
		V. normais		0-3 %	0-10 %	10-50 %	45-75 %	0-6 %	100 %
Grupo	Nº	Raça							
11ZB	004	MB	0	4	35	61	0	100	
	203	SEB	0	10	32	58	0	100	
	302	SEP	0	15	34	50	1	100	
	303	SEB	0	9	41	50	0	100	
	311	MB	0	15	27	58	0	100	
	329	MB	0	5	21	73	1	100	
	432	L	0	12	26	62	0	100	
	436	SEP	0	3	28	69	0	100	
	441	MB	0	1	41	57	1	100	
	502	L	0	11	37	50	2	100	
	504	L	0	14	37	48	1	100	
915	MB	0	6	34	60	0	100		
22ZM	033	MB	0	2	32	65	1	100	
	309	MB	0	1	32	67	0	100	
	364	L	0	14	25	61	0	100	
	402	SEB	0	5	24	69	2	100	
	438	SEP	0	7	50	43	0	100	
	473	MB	0	13	35	52	0	100	
	491	MB	0	0	34	65	1	100	
	509	L	0	5	34	61	0	100	
	514	SEP	0	9	33	57	1	100	
	527	SEB	0	4	56	39	1	100	
	530	SEB	0	10	22	67	1	100	
2004	MB	0	11	29	59	1	100		
33CO	213	SEP	0	12	38	50	0	100	
	303	SEP	0	15	42	43	0	100	
	304	SEB	0	6	39	54	1	100	
	425	L	0	1	54	45	0	100	
	429	L	0	15	35	50	0	100	
	508	L	0	11	45	44	0	100	
	517	SEP	0	6	19	75	0	100	
	522	L	0	9	30	61	0	100	
	523	SEB	0	4	33	61	2	100	
	526	SEB	0	9	29	62	0	100	
	1158	MB	0	5	37	58	0	100	
1958	MB	0	3	14	83	0	100		

Tabela 13 - Fórmulas leucocitárias determinadas para cada animal amostrado (V. normais - valores normais).

Apenas para as ovelhas 438 do grupo 22ZM e 303 e 508 do grupo 33CO foram encontrados valores percentuais de linfócitos ligeiramente inferiores ao normal.

Em termos médios para cada grupo, verifica-se que as fórmulas leucocitárias são normais para a espécie ovina (tabela 14).

Leucócitos		BAS	EOSIN	NEUTR	LYMPH	MONO
		0-3 %	0-10 %	10-50 %	45-75 %	0-6 %
V normais						
11ZM	MÉDIA	0,0	8,8	32,8	58,0	1,2
	DESVIO PADRÃO	0,0	4,9	6,2	7,8	0,4
22ZM	MÉDIA	0,0	7,4	33,8	58,8	1,1
	DESVIO PADRÃO	0,0	4,4	10,0	9,6	0,4
33CO	MÉDIA	0,0	8,0	35,1	57,2	1,5
	DESVIO PADRÃO	0,0	4,6	11,6	12,3	0,7

Tabela 14 - Valores médios e respectivos desvios padrão das percentagens de leucócitos em cada grupo (V. normais - valores normais).

### 3.3.3. Parâmetros bioquímicos sanguíneos

Os soros obtidos a partir dos sangues pertencentes aos animais amostrados foram analisados colorimetricamente por método de química seca, sendo os resultados obtidos os que se assinalam na tabela 15 (os valores normais considerados são os que o VetTest indica).

Em certos parâmetros analisados obtiveram-se valores acima do normal em algumas das ovelhas. É o caso da ALKP, LDH, TBIL, TP, CK.

Os valores de BUN,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  encontraram-se dentro do intervalo considerado normal na maioria dos animais. A CREA e o  $\text{K}^+$  apresentaram valores normais para todas as ovelhas amostradas.

Os resultados observados para a glucose foram inferiores ao normal em todos os animais, com excepção das ovelhas 329 do grupo 11ZB e 1958 do grupo 33CO.

Foram observados valores variáveis de triglicéridos, tanto dentro do intervalo normal, como superiores ou inferiores.

Os resultados médios obtidos para os três grupos em estudo encontram-se, para a maioria dos parâmetros analisados, dentro do intervalo normal da espécie (tabela 16).

O grupo 33CO apresenta um valor um pouco acima do normal para a fosfatase alcalina.

A média da LDH está cima do normal nos grupos 11ZB e 33CO, sendo o valor médio de AST ligeiramente superior ao normal no grupo 22ZM.

O valore médio das proteínas ultrapassa ligeiramente o normal em todos os grupos.

Os 3 grupos apresentam valores de CK superiores ao máximo e de glucose inferior ao valor mínimo considerado normal para ovinos.

Identificação do animal	Parâmetros		ALKP (IU)	LDH (IU)	AST (IU)	TBIL (mg/dl)	TRIG (mg/dl)	TP (g/dl)	GLU (mg/dl)	CK (IU)	CREA (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Cl (mmol/l)	K (mmol/l)	Na (mmol/l)
	Nº	Raça													
11ZB	004	MB	69,00	inválido	70,00	0,56	17,70	8,93	15,00	158,00	0,89	16,60	110,50	5,73	152,30
	203	SEB	98,00	1243,00	109,00	0,40	3,90	8,38	26,90	186,00	0,82	13,20	110,00	4,89	152,00
	302	SEP	83,00	1156,00	93,00	0,30	12,90	8,10	33,30	224,00	0,78	11,90	109,10	4,86	150,70
	303	SEB	154,00	1081,00	95,00	0,29	13,20	7,94	33,00	119,00	0,89	9,70	109,50	4,73	150,50
	311	MB	164,00	1042,00	92,00	0,51	13,00	7,54	43,80	76,00	1,06	14,50	111,20	6,25	154,40
	329	MB	260,00	993,00	90,00	0,35	29,90	7,78	55,00	83,00	0,90	9,40	115,70	5,38	155,80
	432	L	345,00	1496,00	118,00	0,35	19,40	8,58	21,60	116,00	0,73	14,50	108,40	5,74	149,20
	436	SEP	130,00	963,00	101,00	0,43	35,50	7,78	18,30	88,00	0,91	10,50	110,00	5,34	150,10
	441	MB	225,00	1001,00	81,00	0,68	50,90	7,72	24,90	427,00	0,82	14,60	110,60	5,50	151,70
	502	L	571,00	1652,00	97,00	0,46	9,60	7,89	28,40	115,00	0,75	16,00	109,60	4,97	147,90
	504	L	271,00	1113,00	95,00	0,37	42,80	7,77	26,40	80,00	0,84	12,50	114,30	5,26	149,30
	915	MB	96,00	668,00	76,00	0,30	21,80	7,72	26,10	79,00	0,82	14,00	112,30	5,52	151,60
22ZM	364	L	252,00	1623,00	132,00	0,32	0,00	8,27	25,90	77,00	0,69	14,50	110,30	5,14	147,70
	402	SEB	179,00	896,00	93,00	0,49	42,30	7,71	28,30	55,00	0,92	9,40	109,80	4,78	151,90
	438	SEP	125,00	861,00	88,00	0,32	17,90	7,47	24,10	43,00	0,96	9,10	113,00	4,79	152,20
	473	MB	144,00	899,00	inválido	0,36	32,90	8,30	24,50	384,00	0,98	15,90	108,70	5,34	152,10
	491	MB	87,00	>2025	117,00	1,21	22,70	8,77	18,80	469,00	0,99	9,50	110,90	5,80	156,00
	509	L	147,00	928,00	85,00	0,32	25,80	8,30	32,90	78,00	0,81	12,70	110,90	5,62	147,70
	527	SEB	98,00	770,00	107,00	0,42	35,50	7,52	19,90	64,00	0,98	18,10	101,00	5,91	165,40
	530	SEB	152,00	1093,00	89,00	0,25	6,00	7,51	33,30	63,00	0,91	8,90	112,80	4,70	153,10
	2004	MB	88,00	1002,00	72,00	0,66	14,10	8,19	36,00	86,00	0,92	12,50	114,50	5,95	153,90
	213	SEP	264,00	1189,00	81,00	0,50	43,10	8,85	25,90	176,00	0,77	15,90	111,90	4,88	155,70
	303	SEP	161,00	1388,00	75,00	0,40	6,40	8,08	51,30	285,00	0,75	18,00	111,90	5,20	156,70
	33CO	425	L	90,00	1123,00	78,00	0,54	9,40	8,18	35,00	142,00	0,57	13,30	não det	não det
429		L	198,00	1510,00	102,00	0,28	33,30	7,80	32,40	136,00	0,52	20,10	111,20	5,37	154,10
508		L	489,00	1178,00	76,00	0,33	37,20	7,59	26,70	265,00	0,60	13,60	114,40	5,15	155,40
517		SEP	191,00	1504,00	109,00	0,37	13,30	8,04	35,90	208,00	0,67	19,50	111,20	5,25	154,80
522		L	258,00	1144,00	75,00	0,30	15,50	7,84	25,20	144,00	0,68	19,40	111,70	5,13	153,20
523		SEB	136,00	1155,00	94,00	0,26	23,20	7,54	33,70	249,00	0,77	18,20	113,80	4,90	154,30
526		SEB	479,00	1085,00	80,00	0,34	30,20	7,30	32,30	78,00	0,78	18,40	113,60	4,80	156,30
1158		MB	88,00	933,00	84,00	0,32	16,30	8,32	37,20	34,00	1,10	25,10	117,30	5,81	153,60
1958		MB	430,00	927,00	82,00	0,32	43,10	7,82	55,90	59,00	0,93	18,40	110,00	5,20	151,60

Tabela 15 - Parâmetros bioquímicos sanguíneos e ionograma (V. normais - valores normais; não det - não determinado).

GRUPOS	Parâmetros													
	ALKP (IU)	LDH (IU)	AST (IU)	TBIL (mg/dl)	TRIG (mg/dl)	TP (g/dl)	GLU (mg/dl)	CK (IU)	CREA (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Cl (mmol/l)	K (mmol/l)	Na (mmol/l)	
	V. normais													
11ZB	MÉDIA	205,58	1126,18	93,08	0,42	22,55	8,01	29,39	145,92	0,85	13,12	110,93	5,35	151,29
	DESVIO PADRÃO	143,89	266,32	13,28	0,12	14,32	0,41	10,99	100,21	0,09	2,38	2,17	0,44	2,22
22ZM	MÉDIA	141,33	1009,00	97,88	0,48	21,91	8,00	27,08	147,67	0,91	12,29	110,19	5,34	153,33
	DESVIO PADRÃO	52,15	265,80	19,45	0,30	13,91	0,46	6,03	162,52	0,10	3,35	3,88	0,51	5,26
33CO	MÉDIA	253,18	1194,18	85,09	0,36	24,84	7,94	35,59	159,45	0,74	18,17	112,70	5,17	154,57
	DESVIO PADRÃO	148,65	198,55	11,52	0,09	13,39	0,42	9,84	81,42	0,17	3,24	2,11	0,29	1,54

Tabela 16 - Valores médios dos parâmetros bioquímicos sanguíneos e ionograma analisados para cada grupo (V. normais - valores normais).



### **3.4. Discussão**

O zinco integra um grande número de sistemas enzimáticos, tanto como componente molecular, como cofactor (Miller, 1970, McDonald, 1988). Assim, procedemos à avaliação de alguns parâmetros sanguíneos, a fim de verificar se a suplementação da dieta com este oligoelemento, tanto biodisponível como mineral, teria alguma influência a nível do funcionamento desses sistemas enzimáticos.

Analísámos alguns parâmetros de funções hepática e muscular, uma vez que o zinco pode interferir na acção de enzimas relacionadas com estas funções, como por exemplo a fosfatase alcalina, a desidrogenase láctica, ou a creatina fosfoquinase (Benjamin, 1984).

Os parâmetros bioquímicos analisados não revelaram diferenças entre os grupos, excepto a fosfatase alcalina e desidrogenase láctica. Obtiveram-se, para o primeiro, valores normais nos grupos que receberam suplementação alimentar em zinco, tanto biodisponível, como mineral, e um valor médio acima do normal no grupo controlo. Os valores superiores ao normal encontrados para esta enzima podem ser consequência do facto de algumas das ovelhas se encontrarem gestantes, com a consequente contribuição para a formação do esqueleto do feto e da placenta (Benjamin, 1984). Uma vez que o zinco faz parte da molécula de fosfatase alcalina, os resultados da análise deste parâmetro bioquímico sugerem que as ovelhas que receberam suplementação da dieta com zinco respondem mais eficazmente às solicitações metabólicas que se lhes deparam, nomeadamente durante a gestação.

Os valores de LDH foram um pouco superiores ao normal nos grupos 11ZB e 33CO, podendo esse aumento ser o resultado de necrose celular ou de hemólise (Benjamin, 1984).

A taxa de AST foi ligeiramente maior que o valor máximo normal para ovinos no grupo 22ZM, encontrando-se dentro do intervalo normal nos outros grupos. Valores elevados desta enzima podem corresponder a situações de doença hepatocelular, necrose ou degeneração do músculo

esquelético ou cardíaco (Benjamin, 1984). A taxa de AST pode também estar elevada nas afecções hepáticas, não podendo, no entanto, ser esse aumento considerado como específico do fígado (Coles, 1979).

Em todos os grupos os valores da creatina fosfoquinase, enzima relacionada com o metabolismo do músculo esquelético (Benjamin, 1984), são superiores ao máximo considerado normal para a espécie ovina. Tal situação poderá ser explicada pelo esforço realizado pelas ovelhas antes da colheita do sangue, uma vez que a recolha das amostras foi realizada com contenção dos animais.

Verificámos ainda a possível influência do zinco sobre as concentrações de sódio, potássio e cloro, uma vez que este oligoelemento interfere no funcionamento da bomba de sódio-potássio (McDowell, 1992).

O ionograma realizado, em que foram analisados os níveis séricos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  revelou valores para estes iões dentro do intervalo considerado normal para a espécie, não ocorrendo, assim, alterações devidas à suplementação da dieta com zinco.

O zinco participa no metabolismo proteico, lipídico e de hidratos de carbono (McDowell, 1992). Assim, a análise de níveis séricos das proteínas totais, triglicéridos e glucose permitiu avaliar o efeito da suplementação da dieta com este oligoelemento sobre a síntese daqueles compostos.

Embora ocorram variações a nível individual, verificou-se que em quase todos os animais os valores de glucose no sangue se encontravam abaixo do normal. Essa situação poderá ter resultado do facto de as análises não terem sido realizadas imediatamente após a colheita do sangue, uma vez que, quando o soro contacta com o coágulo à temperatura ambiente, a glucose sérica diminui aproximadamente 7% (Benjamin, 1984) ou 10% (Coles, 1979) em uma hora.

As alterações encontradas a nível dos parâmetros sanguíneos poderão ter resultado do facto de o sangue não ter sido analisado imediatamente após a colheita. Contudo, a margem de erro foi igual para todos os animais, pelo que os resultados obtidos são comparáveis entre si.

As variações que se verificam a nível individual dentro dos três grupos em estudo podem resultar da proximidade da época de parição, com as consequentes alterações a nível hormonal, ou ainda a características inerentes aos próprios animais.

As alterações de alguns parâmetros bioquímicos sanguíneos são susceptíveis de corresponder a situações patológicas. No entanto, as ovelhas não aparentavam sinais exteriores de doença, para além de todo o efectivo se encontrar devidamente saneado, pelo que as alterações encontradas nos animais seleccionados para o ensaio não podem ser atribuídas a esse facto.

Os resultados das análises dos parâmetros bioquímicos sugerem que a suplementação da ração com zinco, tanto biodisponível como mineral, não afectou a taxa dessas enzimas nos grupos em estudo, não se verificando alterações a nível da função hepática, decorrentes da suplementação com este oligoelemento. As alterações verificadas a nível da função muscular podem ser imputadas às condições em que o sangue foi recolhido para análise e a alterações decorrentes do tempo que mediou entre a colheita do sangue e a realização das análises.

A fracção celular do sangue não diferiu significativamente entre os grupos em estudo, embora se tenham registado variações individuais entre as ovelhas dos três grupos. Tal facto sugere que, neste ensaio, a suplementação da dieta com zinco não interferiu sobre as células sanguíneas.

As fórmulas leucocitárias determinadas para os três grupos também não diferem entre si de forma expressiva, não sugerindo, assim, a ocorrência de alterações da constituição da fracção leucocitária do sangue na sequência da suplementação da dieta com zinco.

Foi ainda investigada a possível influência do zinco sobre índices reprodutivos, através da análise do período de gestação das ovelhas pertencentes aos grupos em estudo, uma vez que este oligoelemento desempenha um papel importante no balanço hormonal (McDowell, 1992). Observou-se que os partos de todas as que se encontravam em gestação

durante o ensaio (tendo sido inseminadas em Março-Abril) ocorreram no período normal, o que sugere que a suplementação em zinco, tanto biodisponível como mineral, não interferiu a esse nível.

Não foram observados sinais de intoxicação por zinco em nenhum dos animais, o que indica que as doses de zinco incorporadas na ração, tanto de zinco biodisponível como de zinco mineral, não atingiram os níveis tóxicos, não interferindo com o metabolismo geral do organismo.

A análise conjunta dos parâmetros bioquímicos sanguíneos, do ionograma, da composição da fracção celular do sangue e dos índices reprodutivos, bem como a ausência de sinais de toxicidade provocados pelo zinco, sugere que a suplementação da dieta com zinco, tanto biodisponível como mineral, não provoca alterações fisiológicas susceptíveis de afectar o normal funcionamento do organismo.

**4. POSSÍVEL INFLUÊNCIA DO ZINCO NA  
FUNÇÃO FAGOCITÁRIA DE  
NEUTRÓFILOS**

## 4.1. Introdução

Um dos principais mecanismos de defesa do organismo em geral e da glândula mamária em particular deve-se à acção de neutrófilos. Estes leucócitos são os principais responsáveis pela defesa natural contra a mamite, após a entrada do agente etiológico na glândula, estando o seu número aumentado em situação de infecção de modo a eliminar os agentes patogénicos invasores (Craven e Williams, 1985, Burvenich *et al.*, 1994, Lin *et al.*, 1995, Smits *et al.*, 1996).

Para poderem cumprir as suas funções de defesa do organismo, os neutrófilos têm que ser capazes de realizar uma série de acções importantes: adesão ao epitélio vascular, passagem através da parede endotelial, migração para o local da infecção e, finalmente, destruição dos organismos invasores (Doré *et al.*, 1991).

A migração para o local da infecção resulta da resposta a estímulos quimiotácticos, resultantes da presença de microorganismos infectantes ou substâncias por eles libertadas, quando os neutrófilos interagem com os mediadores químicos da inflamação (Burvenich *et al.*, 1994, Stickle, 1996).

Já no local da infecção, inicia-se o processo de fagocitose dos agentes infecciosos. A fagocitose de agentes patogénicos de mamites pelos neutrófilos é reconhecida como um dos principais mecanismos na prevenção do estabelecimento de infecções intramamárias (Schalm *et al.*, 1971 *apud* Paape *et al.*, 1978, Jain, 1979, Paape *et al.*, 1979). A capacidade fagocitária destas células é importante na protecção da glândula mamária (MacDonald *et al.*, 1994) e, por isso, na patogenia da mamite (Daley *et al.*, 1991).

Após a fagocitose, os neutrófilos destroem os agentes patogénicos, conseguindo-o através da libertação de substâncias tóxicas para os microorganismos. Na morte intracelular podem intervir dois tipos de mecanismos: dependentes da presença de oxigénio e independentes da presença deste elemento.

Entre os processos de morte intracelular dependentes da presença do oxigénio, destaca-se a libertação de substâncias tóxicas com actividade microbicida como o superóxido, radicais hidroxilo, radicais livres de oxigénio e o peróxido de hidrogénio (Targowski, 1983, Stickle, 1996).

A formação de ácidos nos fagossomas, a lactoferrina, que exerce um efeito bacteriostático ao formar quelatos com o ferro, necessário ao crescimento bacteriano, a lisozima, que digere as paredes celulares das bactérias, e proteínas catiónicas são mecanismos independentes da presença do oxigénio que podem participar na destruição bacteriana (Targowski, 1983).

A influência do zinco nas funções de neutrófilos não está bem esclarecida. Este oligoelemento desempenha papel importante na resposta imunitária, nomeadamente a nível de funções de neutrófilos sendo essencial para uma actividade óptima destas células, uma vez que dele depende a superóxido-dismutase (Cook-Mills e Fraker, 1993 *apud* Spain, 1993). Esta enzima é necessária à síntese de radicais livres de peróxido de hidrogénio, envolvidos na morte intracelular dos agentes patogénicos fagocitados pelos neutrófilos.

Por outro lado, níveis de zinco ligeiramente abaixo do normal encontram-se associados com uma actividade fagocitária óptima. Níveis fisiológicos deste oligoelemento inibem a fagocitose por macrófagos pulmonares, o mesmo ocorrendo com neutrófilos (Sugarman, 1983). O facto de o zinco contribuir para a estabilização das membranas celulares pode ser o factor determinante na redução da fagocitose realizada pelos neutrófilos, pois dificulta a alteração da forma da membrana celular, necessária à fagocitose dos agentes patogénicos.

Sendo os neutrófilos as principais células fagocitárias presentes na glândula mamária em caso de infecção (Craven e Williams, 1985), é importante determinar a possível contribuição do zinco na prevenção do aparecimento de infecções em animais lactantes.

Dado que a fagocitose é uma das actividades determinantes para um combate à infecção, e que na literatura consultada se encontra referenciada a intervenção do zinco na eficácia fagocitária de neutrófilos, realizámos um ensaio conducente à determinação da possível influência da suplementação da dieta com este oligoelemento sobre esta função de neutrófilos. Foi comparada a acção do zinco biodisponível com a do zinco mineral e com a ausência de suplementação de zinco na dieta dos animais em estudo.

## **4.2. Materiais e métodos**

### **4.2.1. Animais em estudo**

Os animais amostrados para a determinação da possível influência do zinco na função de neutrófilos foram os descritos em 3.2.1.

### **4.2.2. Isolamento de neutrófilos circulantes**

O protocolo experimental para o isolamento de neutrófilos circulantes baseou-se numa adaptação do método descrito por Watson *et al.* (1995a).

Colheram-se amostras de 10ml de sangue da veia jugular de cada ovelha para tubos contendo heparina<sup>13</sup>. As amostras de sangue foram diluídas ao dobro em tampão fosfato salino<sup>14</sup> (PBS) e centrifugadas a

---

<sup>13</sup> Venoject Lithium Heparin, Terumo Europe N. V., Belgium

<sup>14</sup> Sigma



1000×g, durante 20 minutos à temperatura ambiente. As camadas superficiais de plasma, tampão e um quarto a um terço dos glóbulos vermelhos foram aspirados e rejeitados.

Os glóbulos vermelhos remanescentes foram lisados por adição do dobro do volume de células de água destilada, aquecida a 37°C. A tonicidade foi rapidamente reposta com igual volume de PBS/EDTA<sup>15</sup> com concentração dupla, a 37°C. Esta suspensão foi lavada duas vezes por centrifugação a 300×g durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o depósito ressuspendido em PBS, de modo a perfazer 15ml.

A viabilidade dos neutrófilos (PMN) foi determinada pelo teste de exclusão do azul tripano, por contagem numa câmara de Neubauer, e a concentração celular acertada de modo a obter  $2 \times 10^7$  PMNs/ml em PBS.

#### **4.2.3. Ensaio de fagocitose de partículas de latex**

A capacidade fagocitária dos neutrófilos foi avaliada segundo uma adaptação do método descrito por Sartorelli (1990).

Preparou-se uma suspensão de partículas de latex com  $1,07 \mu\text{m}$  de diâmetro<sup>16</sup> em PBS. A concentração de partículas foi determinada por contagem num hematocítmetro, tendo sido realizada uma diluição em PBS, de modo a obter uma concentração de  $8 \times 10^9$  partículas/ml.

Uma suspensão contendo  $2 \times 10^7$  PMNs/ml foi incubada com a suspensão de partículas de latex, no *ratio* de 1 PMN para cada 20 partículas, durante 30 minutos a 37°C.

Terminada a incubação, a fagocitose foi bloqueada por adição de 9ml de uma solução de PBS/EDTA (15mg EDTA/ml PBS) e as células lavadas duas vezes em PBS, de forma a eliminar as partículas não fagocitadas.

---

<sup>15</sup> Etilenodiaminatetracetato, Sigma

<sup>16</sup> Polystyrene Latex Beads, Sigma

As partículas não ingeridas foram solubilizadas com 2ml de dioxano<sup>17</sup>, durante 20h a 37°C.

A capacidade de os PMN fagocitarem as partículas de latex foi determinada espectrofotometricamente<sup>18</sup> pela leitura da densidade óptica (DO) num comprimento de onda de 255nm, face a um branco de dioxano.

### 4.3. Resultados

As leituras das DO para os três grupos, num comprimento de onda de 255nm, face a um branco de dioxano, forneceram resultados que variaram entre 0,018 e 0,209 no grupo 11ZB, entre 0,000 e 0,290 no grupo 22ZM e 0,000 e 0,284 no grupo 33CO, como está descrito na tabela 17.

GRUPO 11ZB			GRUPO 22ZM			GRUPO 33CO		
Identificação		DO	Identificação		DO	Identificação		DO
Nº	Raça		Nº	Raça		Nº	Raça	
004	MB	0,027	033	MB	0,196	213	SEP	0,161
203	SEB	0,184	309	MB	0,000	303	SEP	0,196
302	SEP	0,018	364	L	0,172	304	SEB	0,196
303	SEB	0,161	402	SEB	0,033	425	L	0,000
311	MB	0,027	438	SEP	0,041	429	L	0,209
329	MB	0,078	473	MB	0,172	508	L	0,235
432	L	0,209	491	MB	0,024	517	SEP	0,184
436	SEP	0,018	509	L	0,290	522	L	0,172
441	MB	0,068	514	SEP	0,009	523	SEB	0,209
502	L	0,184	527	SEB	0,000	526	SEB	0,009
504	L	0,047	530	SEB	0,184	1158	MB	0,184
915	MB	0,097	2004	MB	0,209	1958	MB	0,284
<b>MÉDIA</b>		0,100	<b>MÉDIA</b>		0,111	<b>MÉDIA</b>		0,170
<b>DESVIO PADRÃO</b>		0,072	<b>DESVIO PADRÃO</b>		0,102	<b>DESVIO PADRÃO</b>		0,084

Tabela 17 - Resultados do ensaio de fagocitose. Valores expressos em densidade óptica.

Da análise dos resultados constata-se que o grupo 11ZB apresentou valores médios mais baixos - 0,100 -, sendo a mais elevada a do grupo

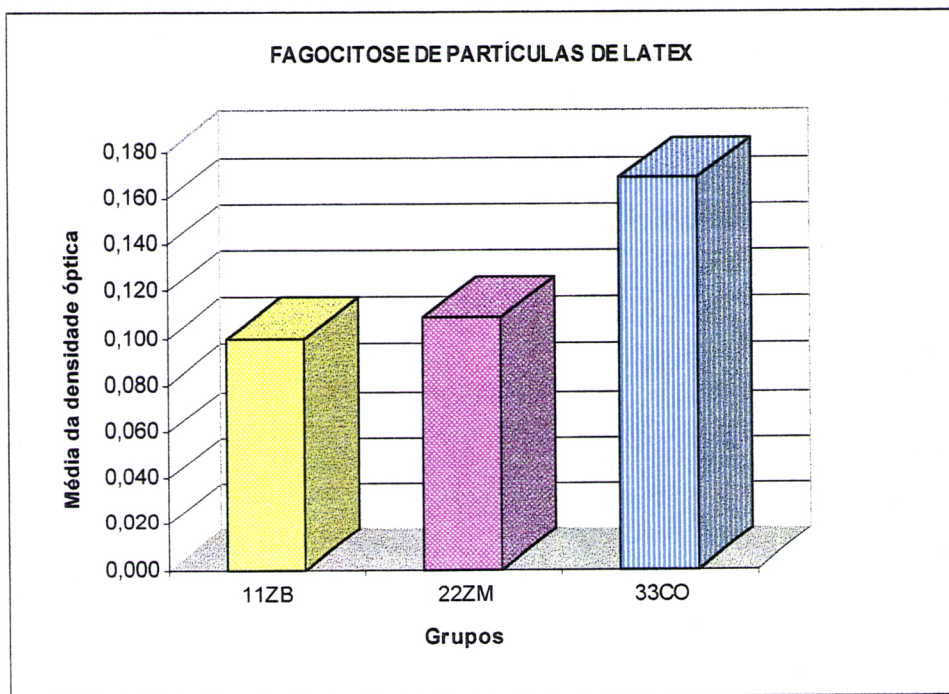
<sup>17</sup> Merck

<sup>18</sup> Ultrospec III, Pharmacia LKN

33CO, 0,170. O grupo 22ZM apresentou valores intermédios, tendo a média sido de 0,111.

Existe uma grande variabilidade individual nos resultados obtidos, conforme pode ser constatado pelos elevados desvios padrão.

O gráfico 4 apresenta as médias das densidades ópticas determinadas para cada grupo no ensaio de fagocitose.



**Gráfico 4** - Média dos valores de fagocitose, expressos em densidade óptica.

#### **4.4. Validação estatística dos resultados**

Para validar os resultados obtidos no ensaio de fagocitose foi realizada a análise de variância (ANOVA), comparando os grupos dois a dois.

Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Epi Info (CDC, WHO, Global Programm on AIDS, version 5,01b-July 1991).

A análise comparativa dos grupos 11ZB e 33CO revela que as diferenças encontradas entre os dois tratamentos, no que diz respeito ao possível efeito do zinco sobre a fagocitose, são significativas ( $p= 0,045533$ ), embora com um valor de  $\chi^2$  baixo ( $\chi^2 = 3,999$ ).

As diferenças encontradas entre o grupo 22ZM e 33CO não são significativas ( $\chi^2 = 1,858$ ,  $p= 0,172879$ ), o mesmo acontecendo quando se comparam as duas formas de suplementação em zinco ( $\chi^2 = 0,001$ ,  $p=0,976925$ ).

#### **4.5. Discussão**

A presença de neutrófilos nas secreções da glândula mamária representa o principal mecanismo de defesa contra o estabelecimento de infecções intramamárias (Burvenich *et al.*, 1994).

A função dos neutrófilos pode ser avaliada a vários níveis: quimiotaxia, fagocitose e morte intracelular. No nosso trabalho, avaliámos a influência do zinco sobre a capacidade fagocitária de polimorfonucleares.

O isolamento dos neutrófilos necessários à realização dos ensaios de fagocitose pode ser efectuado com o auxílio de várias técnicas. No caso particular da avaliação do seu papel na defesa da glândula mamária contra a infecção, os PMNs podem ser obtidos a partir do leite, por centrifugação. No entanto, os neutrófilos presentes na glândula mamária em estado hígido são menos eficientes na fagocitose quando comparados com os neutrófilos circulantes, devido à interferência de componentes do leite (Paape *et al.*, 1979, Nickerson, 1985). Esta redução da eficiência pode dever-se a vários factores, nomeadamente à ingestão de glóbulos de gordura e de caseína, revestimento da superfície pela caseína ou ainda por deficiência na fonte de energia, por conterem pouco glicogénio (Paape e Guidry, 1977, Jain, 1979).

Dado que a capacidade de fagocitar partículas parece encontrar-se diminuída nos neutrófilos residentes da glândula mamária, e, para além disso, cerca de 90% das células somáticas de leite mamático serem neutrófilos provenientes da circulação sanguínea (Miller *et al.*, 1993), recorreremos a neutrófilos circulantes para realizar o ensaio de fagocitose.

A avaliação da capacidade de fagocitose de neutrófilos pode ser realizada por observação microscópica de microorganismos marcados radioactivamente ou com corantes fluorescentes, ou por citometria de fluxo. Neste ensaio, recorreremos à avaliação da capacidade de ingestão de partículas inertes, de latex (Sartorelli, 1990) observáveis ao microscópio óptico, permitindo, assim, o fácil estabelecimento da concentração necessária à realização do ensaio. Este método permite obviar aos inconvenientes resultantes da utilização de microorganismos não marcados, cuja observação intracelular é difícil de realizar ao microscópio óptico pois podem já ter sido destruídos. Evita ainda utilização de substâncias radioactivas para evidenciar as bactérias, visto implicarem cuidados extremos para impedir a formação de resíduos poluentes.

A quantificação da fagocitose por meio de determinação da densidade óptica da suspensão resultante da incubação dos neutrófilos com as partículas de latex, seguida de solubilização das partículas não fagocitadas (Sartorelli, 1990), é um método fiável e expedito para a

quantificação da fagocitose. Estas partículas são eficientemente fagocitadas pelos polimorfonucleares, permitindo distinguir as diferenças existentes entre os grupos sujeitos às várias dietas.

O grupo controlo, que não recebeu suplementação alimentar, foi aquele em que se verificou uma maior média nos valores da DO, traduzindo uma maior actividade fagocitária dos neutrófilos. No grupo 11ZB foi observada a menor média (cf. tabela 17), tendo sido no grupo controlo que se registou um valor médio de DO mais elevado. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p= 0,045533$ ) entre os grupos 11ZB e 33CO, o que sugere um efeito negativo da suplementação da dieta com zinco biodisponível a nível da eficiência fagocitária dos neutrófilos.

Entre os grupos 22ZM e 33CO também foram encontradas diferenças, embora sem significado estatístico, tendo a média da DO sido superior no grupo 33CO, o que parece indicar que também a forma mineral de zinco utilizada na suplementação da ração afecta negativamente a capacidade fagocitária dos neutrófilos.

O facto de se ter verificado que o grupo que recebeu na sua dieta uma suplementação de zinco biodisponível foi o que apresentou um valor médio para a DO está de acordo com o que foi descrito por Sugarman (1983). Este autor refere que níveis fisiológicos de zinco (superiores a 0,1nM) inibem a fagocitose. Uma possível explicação para este facto poderá residir, segundo aquele autor, no facto de o zinco poder contribuir para a estabilização dos microtúbulos e neurotúbulos, que participam nos movimentos intracelulares e na motilidade celular, dificultando os movimentos necessários à formação de pseudópodes. Em estudos realizados com ratos, Sugarman, (1983) verificou que ocorria inibição da fagocitose como doses de zinco entre  $10^{-7}$  e  $10^{-5}$ M, ou após o fornecimento diário de 5mgde zinco/kg durante 10 a 20 dias. A suplementação da alimentação de animais como cerca de  $200\mu\text{g}/100\text{ml}$  (aproximadamente o dobro da concentração normal) com o objectivo de aumentar os níveis

séricos de zinco, desencadeou uma redução na mobilização de PMNs e macrófagos para a cavidade peritoneal e uma redução da fagocitose.

Para além das diferenças encontradas entre os grupos sujeitos a dietas com diferentes formas de zinco, observaram-se também variações elevadas em termos individuais. Várias razões poderão ser apontadas para o facto acima exposto, nomeadamente o estado fisiológico em que os animais se encontravam, a proximidade do parto (Guidry *et al.*, 1976, Hoedemaker *et al.*, 1992, Cai *et al.*, 1995), o tratamento anterior com antibióticos (Ziv *et al.*, 1983, Nickerson *et al.*, 1985, Paape *et al.*, 1990, Paape *et al.*, 1991, Myers *et al.*, 1995) ou corticosteróides (Paape *et al.*, 1981, Burton e Kehrl, 1995), ou apenas factores inerentes ao próprio animal (Paape *et al.*, 1978, Paape e Pearson, 1979).

Algumas das ovelhas amostradas encontravam-se na fase final de gestação (cf. Anexo A), o que se sabe conduz a alterações na capacidade fagocitária dos neutrófilos. A proximidade do parto poderá ser uma das razões para as variações observadas, uma vez que nessa altura ocorrem alterações a nível hormonal, nomeadamente de corticosteróides (Smith *et al.*, 1973 *apud* Guidry *et al.*, 1976, Cooper *et al.*, 1972 *apud* Guidry *et al.*, 1976), responsáveis por uma diminuição da capacidade de fagocitose (Guidry *et al.*, 1976).

O tratamento de infecções com antibióticos também pode ser responsável pelas diferenças registadas. Elevadas concentrações de antibióticos podem ter efeitos adversos nas funções de PMNs do leite *in vitro*, o que parece indicar que certos fármacos podem afectar a capacidade da glândula mamária desencadear uma resposta eficaz contra a infecção (Ziv *et al.*, 1983, Nickerson *et al.*, 1985, Paape *et al.*, 1991).

Um dos fármacos que afecta a actividade fagocitária dos neutrófilos é a oxitetraciclina, utilizada no tratamento dos casos de mamite detectados no efectivo em estudo. Em trabalhos realizados com neutrófilos circulantes foi observada uma inibição da actividade antibacteriana dos neutrófilos (Myers *et al.*, 1995). As alterações na capacidade fagocitária observadas entre as

ovelhas do mesmo grupo podem ter resultado do tratamento com este antibiótico.

A utilização de corticosteróides no tratamento de mamites também parece afectar a capacidade fagocitária dos neutrófilos (Paape *et al.*, 1981, Paape *et al.*, 1991). Assim o tratamento dos animais infectados com dexometazona também pode ter sido responsável pelas diferenças observadas individualmente.

As diferenças individuais observadas poderão ainda ser inerentes ao próprio animal. Em bovinos leiteiros, foram observadas diferenças na susceptibilidade da infecção intramamária entre vacas e entre quartos de cada glândula mamária (Schalm *et al.*, 1971 *apud* Paape *et al.*, 1978). Ainda em bovinos, verificou-se variação na capacidade de controle e limitação da infecção, o que se deve à variação na capacidade fagocitária das suas células somáticas (Nickerson e Heald, 1981, Paape e Wergin, 1977 *apud* Gudding *et al.*, 1984). As mesmas observações poderão ser extrapoladas para ovelhas.

Os resultados do presente ensaio sugerem um efeito negativo da suplementação da alimentação com zinco, particularmente sob a forma biodisponível, sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos circulantes. Uma vez que a população de PMNs residente da glândula mamária provém da circulação sanguínea, poder-se-á verificar uma situação semelhante, tanto mais que a sua actividade fagocitária já se encontra diminuída. Importa, pois, em trabalhos futuros, determinar a possível influência do zinco sobre as outras funções desempenhas pelos neutrófilos: quimiotaxia e morte intracelular.



**5. POSSÍVEL INFLUÊNCIA DO ZINCO NA  
ADESÃO BACTERIANA A EPITÉLIO DA  
GLÂNDULA MAMÁRIA**

## 5.1. Introdução

A adesão bacteriana a células epiteliais do hospedeiro é considerada a fase inicial de vários processos infecciosos (Aly e Levit, 1987, Ofek e Beachey, 1980 *apud* Olmsted e Norcross, 1992, Isberg, 1991, Cree *et al.*, 1995), uma vez que é essencial à sobrevivência do agente microbiano, libertação eficiente de toxinas e subsequente patogenia (Ferreira-Dias *et al.*, 1993). A ligação a superfícies celulares favorece a capacidade de sobrevivência e multiplicação dos microorganismos, principalmente em *lumina* que estão sujeitas a acções periódicas de arrastamento de fluídos orgânicos (Gudding *et al.*, 1984)

Muitas bactérias patogénicas aderem à superfície de células do hospedeiro, particularmente a tecido epitelial (Kimura *et al.*, 1990) e permanecem localizadas extracelularmente (Lee *et al.*, 1989, Isberg, 1991). A adesão à superfície celular facilita a colonização das camadas epiteliais no início do processo de infecção, tornando mais fácil a difusão a tecidos adjacentes à medida que o processo infeccioso se desenvolve (Isberg, 1991).

Na adesão bacteriana a células do hospedeiro estão envolvidos mecanismos específicos e não específicos. Estes últimos incluem forças hidrofóbicas e lipofílicas, carga eléctrica superficial, fibronectina (Abraham *et al.*, 1983, Switalski *et al.*, 1983, Caparon *et al.*, 1991) e moléculas de adesão afins à fibronectina (Peterson *et al.*, 1983, Courtney *et al.*, 1986, Ferreira-Dias *et al.*, 1993). A adesão específica pode ser mediada por adesinas (Beachey, 1981), ácido teicóico, no caso de *Staphylococci* (Aly e Levit, 1987) ou lectinas presentes na superfície do microorganismo que se ligam a polissacáridos existentes à superfície da célula, por meio de um mecanismo semelhante a chave-fechadura (Bar-Or, 1990, Isberg, 1991, Beachey, 1981, Urisu *et al.*, 1986, Ferreira-Dias *et al.*, 1993).

O modo de adesão e subsequente infecção varia com o tecido do hospedeiro e a espécie bacteriana (Beachey, 1981), tendo sido observadas diferenças entre espécies e estirpes bacterianas em ensaios de adesão *in vitro* a células epiteliais da glândula mamária (Frost, 1975, Opdebeek *et al.*, 1988 e Wanasinghe, 1981b). A localização do epitélio em diferentes regiões da glândula mamária (canal do teto *versus* seio leiteiro) também influencia a adesão (Frost *et al.*, 1977 *apud* Wanasinghe, 1981b).

Aparentemente a adesão bacteriana desempenha um papel importante no estabelecimento de infecções intramamárias (Frost, 1975, Wanasinghe, 1981b, Amorena *et al.*, 1990), embora haja alguma controvérsia em relação a esta hipótese (Anderson, 1978).

A maioria dos autores afirma que a colonização e posterior infecção da glândula mamária são facilitadas pela adesão bacteriana às células epiteliais (Wanasinghe, 1981a, Aly e Levit, 1987, Isberg, 1991, Ofek e Beachey, 1980 *apud* Olmsted e Norcross, 1992, Amorena *et al.*, 1990), considerando este mecanismo essencial para o estabelecimento de infecções intramamárias.

No entanto, a importância da adesão bacteriana ao epitélio da glândula mamária no estabelecimento de infecção é controversa. Anderson, (1978), num estudo realizado em murganhos, inoculados com estirpes *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae* causadoras de mamites em ruminantes, concluiu não ter ocorrido adesão da generalidade das espécies ao epitélio da glândula mamária, pelo menos suficientemente forte para resistir ao arrastamento pelo leite. Afirma este autor que a adesão bacteriana não deve ser invocada como um factor essencial para o estabelecimento da mamite.

Vários autores demonstraram que a adesão bacteriana ao epitélio da glândula mamária é um estágio importante na patogénese da mamite bovina (Frost, 1975, Wanasinghe, 1981b, Gudding *et al.*, 1984), sendo reconhecido que adesão selectiva a células epiteliais é factor que contribui para a capacidade de os microorganismos infectarem a glândula mamária (Wanasinghe, 1981b). A ligação do microorganismo à superfície do tecido

epitelial que reveste a glândula mamária permite-lhe evitar a eliminação pelos mecanismos de renovação celular do epitélio do hospedeiro (Ofek *et al.*, 1977 *apud* Wanasinghe, 1981b), assim como arrastamento, pelos fluídos da glândula ou durante a ordenha (Olmsted e Norcross, 1992), possibilitando a colonização e o desencadear do processo infeccioso.

A integridade da mucosa do canal do teto está estritamente relacionada com a prevenção de mamites, constituindo as células epiteliais normais a primeira linha de defesa inespecífica contra a infecção (Spain, 1993). Esta integridade está relacionada com o revestimento de queratina, que constitui uma barreira física e química na protecção da glândula mamária (Bitman *et al.*, 1991). A remoção parcial da queratina pode resultar num aumento temporário da susceptibilidade do canal do teto (McDonald, 1970 *apud* Craven e Williams, 1985), comprometendo a capacidade de evitar a penetração de microorganismos no interior da glândula e tornando-a mais susceptível infecção (Capuco *et al.*, 1992).

Uma das formas de prevenir o estabelecimento de infecções intramamárias reside na suplementação da dieta dos animais com oligoelementos que se sabe intervirem nas funções de defesa inespecíficas. Um desses elementos é o zinco, que desempenha um papel fundamental na defesa dos tecidos epiteliais, encontrando-se a resistência do tecido epitelial à infecção em situação de carência deste metal (Suttle e Jones, 1989). O efeito deste oligoelemento faz-se sentir nomeadamente no processo de queratinização, essencial para a manutenção da integridade do epitélio da glândula mamária. Está descrito que o zinco fornecido de forma biodisponível é mais eficiente que o zinco mineral, acelerando aquele processo (Spain, 1993).

No nosso trabalho avaliámos a possível influência do zinco na defesa da glândula mamária foi realizando ensaios de adesão bacteriana a epitélio da glândula mamária. Foram testadas três técnicas distintas: adesão bacteriana a células epiteliais em suspensão e a células epiteliais

previamente fixadas e adesão a tecido epitelial da cisterna da glândula mamária.

## **5.2. Materiais e métodos**

### **5.2.1. Preparação da suspensão bacteriana**

Os ensaios de adesão bacteriana foram conduzidos com uma estirpe de *Staphylococcus xylosus*, isolada de um caso de mamite subclínica identificado na exploração em que decorreram os ensaios.

A estirpe bacteriana encontrava-se congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , numa suspensão de 10% de glicerol<sup>19</sup> em Brain-Heart Infusion Broth<sup>20</sup> (BHIB). A partir desta suspensão foi efectuada uma subcultura em caldo de triptose<sup>20</sup> (CT) e incubada 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  em aerobiose. Foi feita uma nova subcultura para placas de agar sangue, que foram incubadas durante 18 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ . A partir desta subcultura preparou-se uma suspensão bacteriana em 10ml tampão fosfato salino, pH 7,4 (PBS).

Realizou-se a contagem de bactérias viáveis pelo método das placas de Petri (Quinn *et al.*, 1994), com base em diluições seriadas de base 10 da suspensão bacteriana. Volumes de 1ml de cada uma das diluições foram inoculados, por incorporação e em duplicado, em placas de Plate Count Agar<sup>21</sup> (PCA) e incubadas 24 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose. Determinou-se, por contagem nas placas que continham entre 30 e 300 colónias, o número de unidades formadoras de colónias (UFC)/ml. Foi calculada a média das

---

<sup>19</sup> Merck

<sup>20</sup> Oxoid

<sup>21</sup> Plate Count Agar Standard (APHA), Oxoid

duas placas, tendo sido utilizada no estabelecimento da concentração da suspensão bacteriana.

A densidade óptica das suspensões bacterianas tituladas foi determinada espectrofotometricamente, por leitura a um comprimento de onda de 610nm, face a um branco de PBS, tendo sido construída uma curva com os valores assim obtidos.

Correlacionou-se a DO assim determinada para cada suspensão com a sua concentração em UFC/ml, daí resultando uma curva padrão (anexo D) que permitiu, sempre que necessário, estabelecer a relação entre estes dois parâmetros.

Com base nessa curva, preparou-se uma suspensão bacteriana com uma concentração de  $10^9$  UFC/ml.

### **5.2.2. Obtenção de epitélio da glândula mamária**

De cada grupo em estudo foram sacrificadas duas ovelhas de raça Merino Branco:

- grupo 11ZB: ovelhas 311 e 329;
- grupo 22ZM: ovelhas 309 e 2004;
- grupo 33CO: ovelhas 1158 e 1198.

As glândulas mamárias foram retiradas logo após o abate, transportadas em recipientes refrigerados e processadas no espaço de 4 horas. As glândulas foram dissecadas assepticamente, a partir do canal do teto até à cisterna, e lavadas com Hanks Balanced Salt Solution<sup>22</sup> (HBSS) para retirar algumas secreções mamárias ainda presentes.

---

<sup>22</sup> Sigma

### **5.2.2.1. Células epiteliais**

Retiraram-se células epiteliais da cisterna da glândula mamária utilizando uma escova de dentes suave, segundo a técnica descrita por Vilela (1993). As células foram recolhidas para um tubo estéril contendo 50ml de PBS e determinou-se o número de células viáveis por contagem numa câmara de Neubauer, usando o teste de exclusão do azul tripano. Acertou-se a concentração celular de modo a obter  $10^6$  células/ml em PBS.

### **5.2.2.2. Tecido epitelial**

De cada glândula mamária foram retiradas assepticamente duas amostras de epitélio da cisterna com cerca de  $5\text{mm}^3$ . As amostras foram lavadas com PBS estéril numa placa de Petri.

### **5.2.3. Ensaio de adesão**

A avaliação da possível influência do zinco na adesão bacteriana ao epitélio da glândula mamária foi efectuada por meio de três técnicas: adesão a células epiteliais dispersas, adesão a células epiteliais previamente fixadas e adesão a tecido epitelial da cisterna da glândula.

#### **5.2.3.1. Ensaio de adesão a células epiteliais dispersas**

O protocolo experimental do ensaio de adesão a células epiteliais dispersas baseou-se na adaptação dos métodos descritos por Wanasinghe, (1981a) e Olmsted e Norcross (1992).

Foram distribuídos 0,5ml de suspensão celular contendo  $10^6$  células/ml e 0,5ml de suspensão bacteriana com  $10^9$  UFC/ml. Os tubos

foram incubados a 4°C, durante 1 hora, agitando cada 10 minutos. Em seguida lavaram-se as células três vezes em PBS por centrifugação a 300×g, durante 10 minutos, para eliminar as bactérias não aderentes, desprezando-se sempre o sobrenadante.

Com o depósito resultante foram efectuadas preparações microscópicas em duplicado, coradas pelo método de Gram.

As preparações microscópicas foram observadas ao microscópio óptico, com objectiva de imersão e ampliação de 1 000×.

A adesão foi quantificada por contagem aleatória de 50 células de cada preparação efectuada, isto é, um total de 100 células por ovelha. Registou-se o número de células com bactérias aderentes bem como o número de bactérias aderentes a cada célula.

Como controlos negativos, utilizaram-se suspensões celulares sujeitas a protocolo experimental idêntico, mas substituindo-se as suspensões bacterianas por PBS estéril.

#### **5.2.4. Ensaios de adesão a células epiteliais previamente fixadas**

A elaboração protocolo a seguir na realização deste ensaio teve como base uma adaptação do método descrito por Amorena *et al.* (1990).

As células epiteliais foram obtidas e preparadas da forma descrita em 5.2.2.1. A concentração celular utilizada também foi idêntica, isto é, 10<sup>6</sup> células/ml.

Volumes de 0,1ml de suspensão celular foram depositados em lâminas de microscópio por centrifugação (Cytospin<sup>23</sup>) a 1 000rpm, durante 5 minutos. As lâminas, realizadas em duplicado, foram secas ao ar, sendo depois submetidas a uma fixação ligeira com paraformaldeído<sup>24</sup> a 1%, durante 15 minutos a 4°C. Foram guardadas à mesma temperatura até à sua utilização, 24 horas depois.

---

<sup>23</sup> Cytospin 2, Shandon

<sup>24</sup> Merck



As lâminas foram incubadas com 20ml de suspensão bacteriana ( $10^9$  UFC/ml) em PBS durante 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . Seguiram-se 10 lavagens com PBS/Tween 20<sup>25</sup> (0,05% v/v), para eliminar as bactérias não aderentes, e uma fixação com metanol durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Coraram-se pelo método de Gram e foram observadas ao microscópio óptico, com uma ampliação de 1 000× e objectiva de imersão.

O grau de adesão foi quantificado pela contagem aleatória de 100 células em cada lâmina, num total de 200 células por ovelha. Registou-se o número de células com bactérias aderentes e o número de bactérias aderente a cada célula.

#### **5.2.5. Ensaio de adesão a tecido epitelial da cisterna mamária**

A elaboração do protocolo experimental deste ensaio baseou-se na adaptação do método descrito por Ferreira-Dias *et al.* (1994).

Foram utilizadas as duas amostras de tecido epitelial da cisterna da glândula mamária. Uma das amostras foi incubada com 0,5ml de suspensão bacteriana com  $10^9$  UFC/ml durante 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ , agitada a intervalos de 10 minutos. A outra amostra, o controlo negativo, foi incubada com 0,5ml de PBS e sujeita às mesmas condições que a anterior.

Após a incubação, as amostras de epitélio foram lavadas 3 vezes por imersão em PBS durante 10 minutos e fixadas em glutaraldeído<sup>26</sup> a 3% em PBS durante 3 horas. Seguiu-se a desidratação seriada em banhos etanol<sup>26</sup> a 25%, 50%, 75%, 80%, 95% durante 10 minutos. As amostras foram ainda desidratadas em etanol absoluto e xilol<sup>26</sup> duas vezes, durante 1 hora.

Para preparar os blocos de inclusão em parafina, as amostras de epitélio foram imersas num banho de parafina<sup>27</sup> com ponto de fusão de  $52^\circ\text{C}$ , durante 4h e moldado o bloco, que secou ao ar.

---

<sup>25</sup> Sigma

<sup>26</sup> Merck

<sup>27</sup> V. Reis Limitada

Foram realizados 4 cortes com 4  $\mu\text{m}$  de espessura, com o auxílio de um micrótomo de corredeira<sup>28</sup>. Os cortes foram colocados nas lâminas e secos durante 24 horas, a 37°C.

As preparações foram desparafinadas com xilol e os cortes rehidratados com etanol absoluto, a 90% e a 70% e lavadas com água destilada. As lâminas foram coradas pelo método de Gram e desidratadas novamente com etanol absoluto e xilol. A montagem foi efectuada com entellan<sup>8</sup>.

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico, com uma ampliação de 1 000 $\times$ . Contaram-se aleatoriamente 500 células em cada lâmina e o número de bactérias aderentes ao polo apical de cada uma, num total de 1000 células por ovelha.

## **5.3. Resultados**

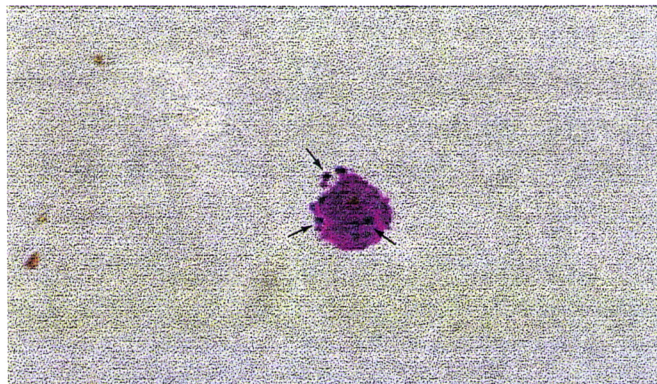
### **5.3.1. Ensaio de adesão a células epiteliais dispersas**

No ensaio de adesão a células em suspensão procedeu-se à contagem aleatória de 100 células (50 em cada lâmina pertencente a cada animal) e ao número de bactéria aderentes a cada uma delas.

Nas lâminas preparadas com a suspensão celular incubada com bactérias observaram-se células com bactérias aderentes a todas as superfícies expostas e não apenas a um dos polos. Verificou-se a existência de um grande número de agregados formados por detritos celulares, aos quais também se encontravam associadas bactérias (figura 1).

---

<sup>28</sup> Leica SM 200 R



**Figura 1** - Célula epitelial com bactérias aderentes.

Os resultados de adesão bacteriana obtidos para cada animal estão expostos na tabela 18.

Animal		Células com bactérias aderentes			Bactérias aderentes		
					total em 100 células	por célula epitelial	
Grupo	Nº	total	média	desvio padrão		média	desvio padrão
<b>11ZB</b>	311	70	0,72	0,45	207	2,07	2,19
	329	72	0,70	0,46	209	2,09	2,28
<b>22ZM</b>	309	81	0,81	0,39	276	2,76	2,70
	2004	81	0,81	0,39	324	3,24	3,32
<b>33CO</b>	1158	88	0,88	0,33	336	3,36	2,67
	1958	88	0,88	0,33	340	3,40	2,49

**Tabela 18** - Resultados do ensaio de adesão a células em suspensão. Número de células com bactérias aderentes e número de bactérias aderentes por célula, para cada animal de cada grupo.

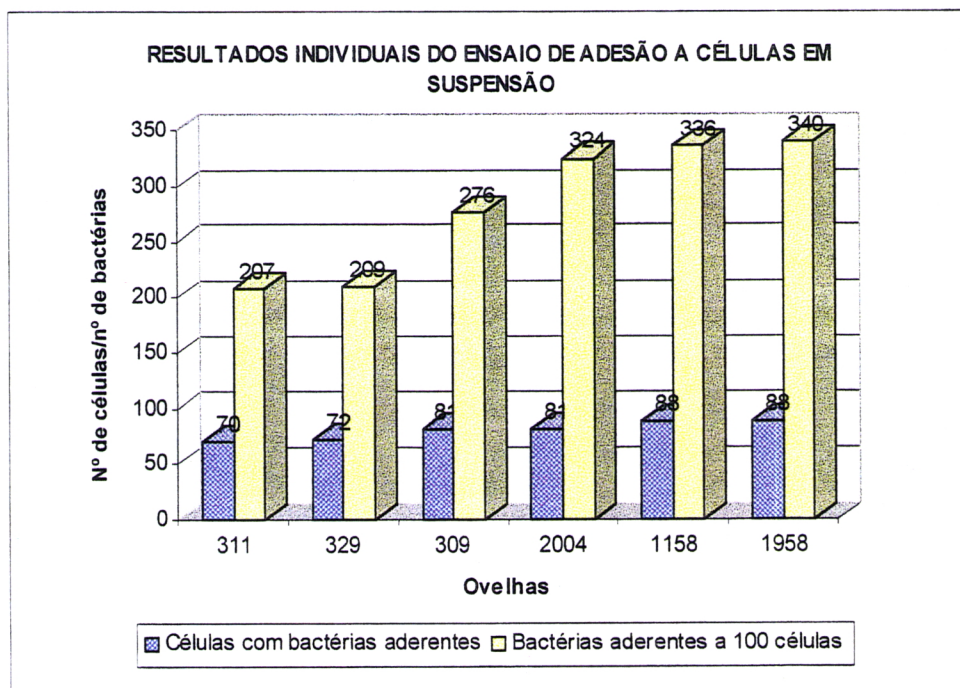
Na ovelha nº311, pertencente ao grupo 11ZB observou-se um total de 70 células com bactérias aderentes; no animal nº329, pertencente ao mesmo grupo, contaram-se 72 células com bactérias aderentes e um total de 209 bactérias aderentes.

No grupo 22ZM, em ambas as lâminas se contaram 81 células com bactérias aderentes. Na ovelha nº309 verificou-se a presença de 276 bactérias aderentes enquanto que para a nº2004 esse número foi de 324.

No grupo 33CO, foi encontrado o mesmo número de células com bactérias aderentes nos dois animais. O número de bactérias aderentes foi de 336 para a nº1158 e 340 para a nº1958.

Em nenhuma das lâminas dos controlos negativos foram encontradas células com bactérias aderentes.

No gráfico 5 encontram-se resumidos os resultados acima descritos.



**Gráfico 5** - Adesão de *S. xylosus* a células em suspensão. Número médio de bactérias aderentes por célula e por ovelha.

Agrupando os dados individuais, obtêm-se os resultados de cada grupo (tabela 19).

Grupo	Células com bactérias aderentes			Bactérias aderentes		
	total	média	desvio padrão	total	por célula epitelial	
					média	desvio padrão
<b>11ZB</b>	142	0,71	0,45	416	0,11	0,42
<b>22ZM</b>	162	0,81	0,39	485	0,25	0,62
<b>33CO</b>	176	0,88	0,33	600	0,45	1,00

**Tabela 19** - Resultados do ensaio de adesão a células em suspensão para cada grupo. Número médio de células com bactérias aderentes e de bactérias aderentes a células epiteliais em cada grupo.

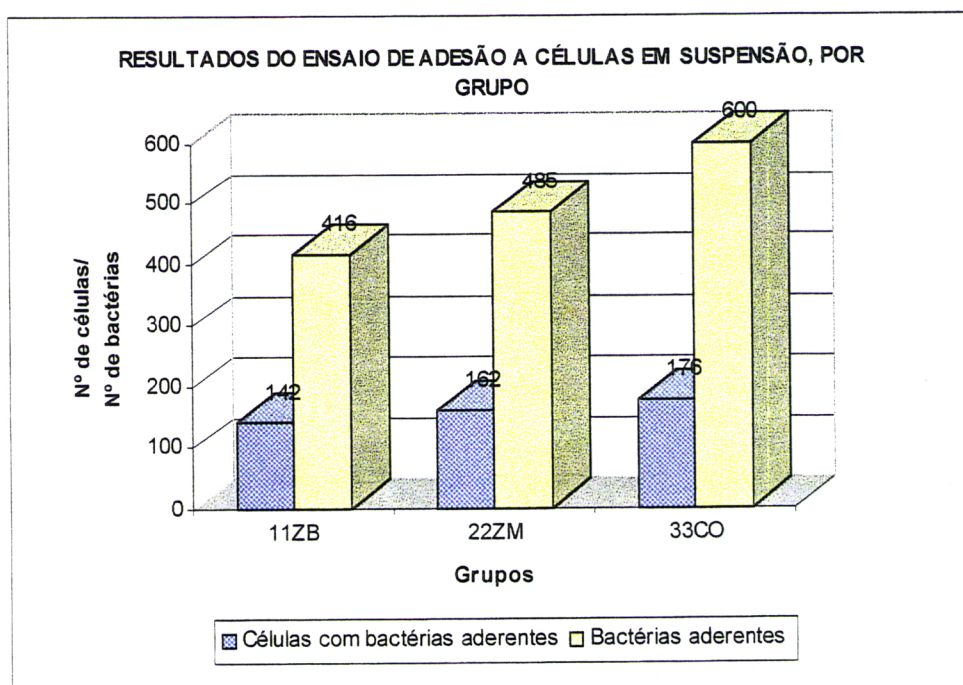
Por grupo, os resultados foram de 142 células com bactérias aderentes para o grupo 11ZB, 162 para o grupo 22ZM e 176 para o grupo 33CO.

O número total de bactérias aderentes a células epiteliais foi 416 no grupo 11ZB, 485 no grupo 22ZM e 600 no grupo 33CO.

Verifica-se que o grupo 11ZB foi aquele em que se registou um menor número de células com bactérias aderentes, bem como de bactérias aderentes. Seguiu-se-lhe o grupo 22ZM, tendo sido no grupo 33CO que se registaram os maiores valores de contagens, tanto de células como de bactérias aderentes a células epiteliais.

O gráfico 6 traduz os resultados acima referidos.

Nas lâminas de controlo negativo realizadas para cada animal não foram encontradas quaisquer células com bactérias aderentes.



**Gráfico 6** - Valores médios de adesão de *S. xylosus* a células em suspensão observados em cada grupo.

### 5.3.2. Ensaios de adesão a células epiteliais previamente fixadas

Nas lâminas do ensaio de adesão a células previamente fixadas foram contadas 100 células por lâmina, em 2 lâminas, e o número de bactérias aderentes por célula.

Nas lâminas incubadas com a suspensão bacteriana foi possível observar células com bactérias aderentes a todas as superfícies. Verificou-se ainda a ocorrência de adesão bacteriana a agregados de células e a detritos celulares (figura 2).

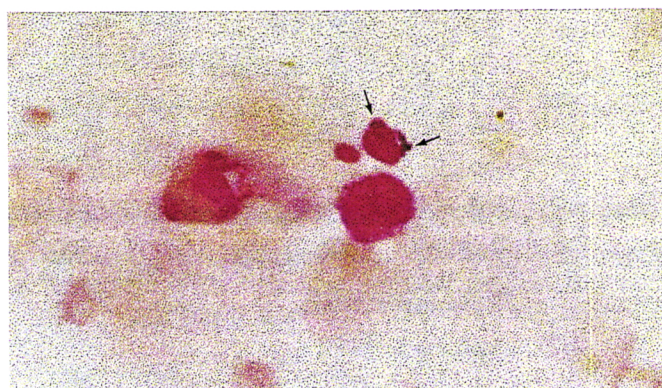


Figura 2 - Células epiteliais previamente fixadas com bactérias aderentes.

Os resultados individuais estão expostos na tabela 20.

Animal		Células com bactérias aderentes			Bactérias aderentes		
					total em 200 células	por célula epitelial	
Grupo	Nº	total	média	desvio padrão	total em 200 células	média	desvio padrão
<b>11ZB</b>	311	12	0,06	0,24	20	0,10	0,12
	329	18	0,09	0,29	23	0,45	0,39
<b>22ZM</b>	309	44	0,22	0,42	68	0,34	0,75
	2004	26	0,13	0,34	32	0,16	0,45
<b>33CO</b>	1158	53	0,27	0,44	113	0,57	1,15
	1958	36	0,21	0,40	65	0,33	0,82

Tabela 20 - Resultados do ensaio de adesão a células previamente fixadas. Número de células com bactérias aderentes e número de bactérias aderentes por célula, para cada animal de cada grupo.

No grupo 11ZB, verificou-se a existência de 12 bactérias nas células da ovelha 311 e 18 na 329. No grupo 22ZM o número de células com bactérias aderentes foi de 44 para a 309 e 26 para a 2004. No grupo 33CO foram observadas 53 células com bactérias na 1158 e 36 na 1958.

O total de bactérias aderentes em 200 células foi, para o grupo 11ZB, 20 na 311 e 23 na 329. No grupo 22ZM, observaram-se 68 na 309 e 32 na 2004. No grupo 33CO, os resultados foram de 113 bactérias aderentes na 1158 e 63 na 1958.

Em termos gráficos, os resultados descritos tomam a seguinte forma:

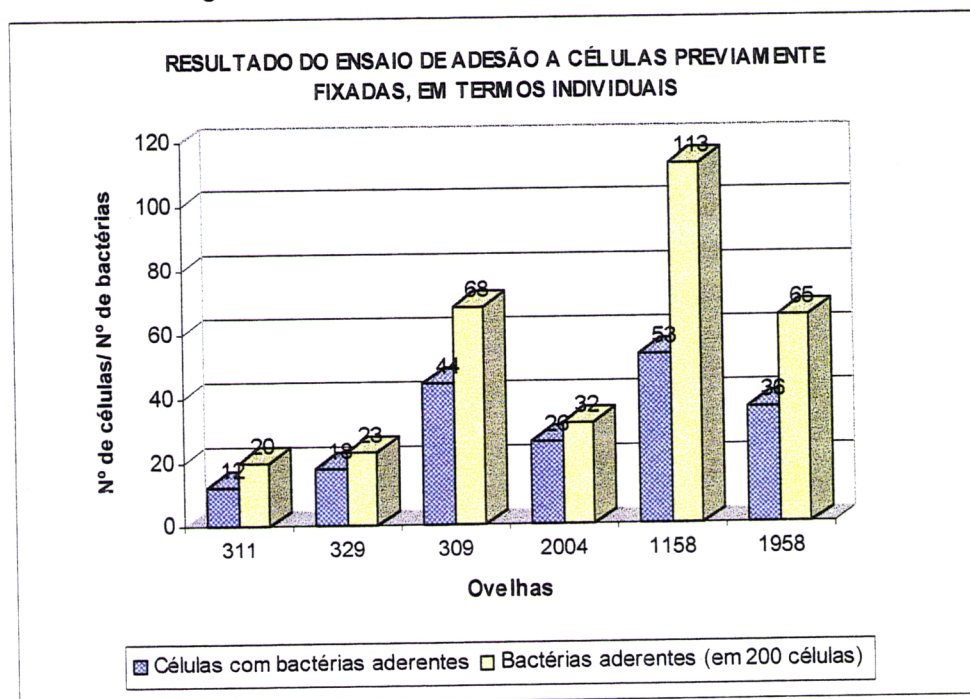


Gráfico 7 - Adesão de *S. xylosus* a células previamente fixadas. Número médio de bactérias aderentes por célula e por ovelha.

A tabela 21 mostra os resultados de cada grupo.

Grupo	Células com bactérias aderentes			Bactérias aderentes		
	total	média	desvio padrão	total	por célula epitelial	
					média	desvio padrão
<b>11ZB</b>	30	0,08	0,24	43	0,11	0,42
<b>22ZM</b>	70	0,18	0,38	100	0,25	0,62
<b>33CO</b>	89	0,22	0,42	178	0,45	1,00

Tabela 21 - Resultados do ensaio de adesão a células previamente fixadas para cada grupo. Número médio de células com bactérias aderentes e de bactérias aderentes a células epiteliais em cada grupo.

Verificou-se a ocorrência de 30 células com bactérias aderentes no grupo 11ZB, 70 no grupo 22ZM e 89 no grupo 33CO.

O número de bactérias aderentes foi de 43 no grupo 11ZB, 100 no grupo 22ZM e 178 no grupo 33CO.

O grupo 11ZB foi aquele que apresentou menores valores de células com bactérias aderentes e de bactérias aderentes às células. O grupo 22ZM apresentou valores intermédios, tendo o grupo controlo (33CO) sido aquele em que se encontraram mais células com bactérias aderentes e bactérias aderentes às células.

O gráfico 8 mostra os resultados obtidos neste ensaios, para cada grupo.

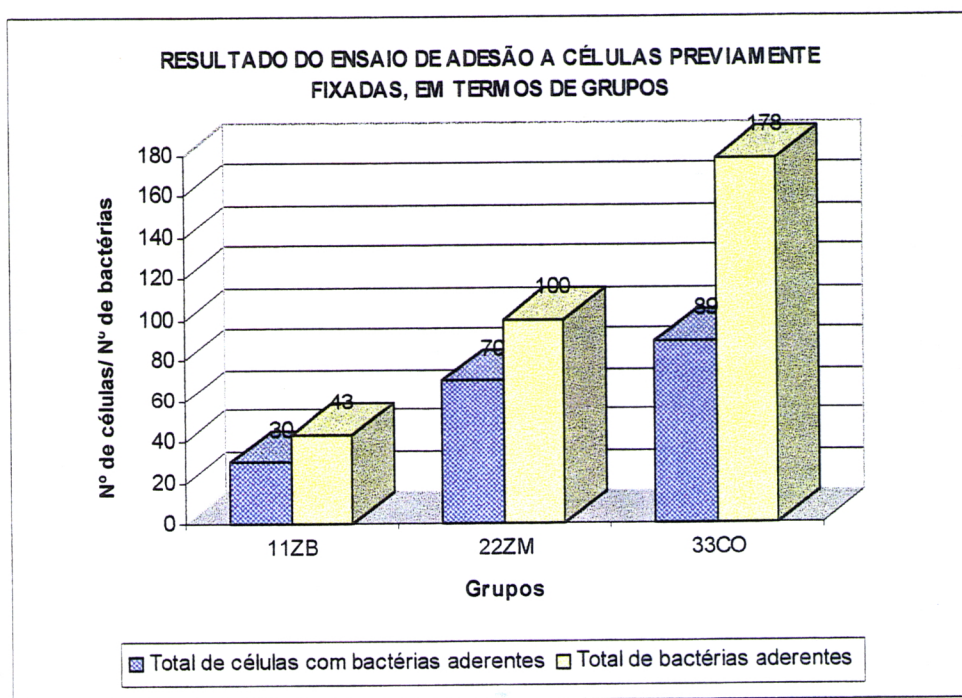


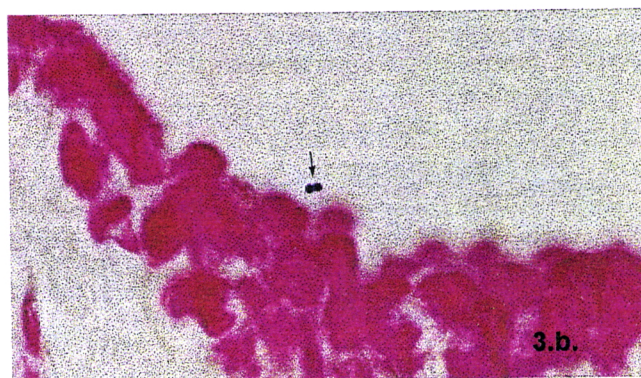
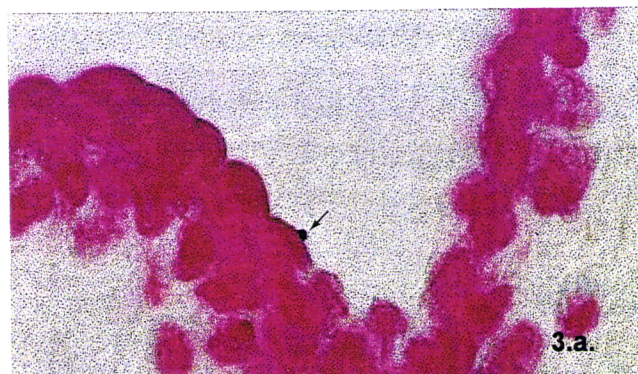
Gráfico 8 - Valores médios de adesão de *S. xylosus* a células previamente fixadas observados em cada grupo.

### 5.3.3. Ensaio de adesão a tecido epitelial da cisterna mamária

Nestes ensaios de adesão apenas foram consideradas nas contagens as células epiteliais ligadas à membrana basal (figuras 3 e 4).



Nos cortes histológicos realizados para observar a adesão a tecido epitelial da glândula mamária observam-se algumas células com uma ou várias bactérias aderentes. Verificou-se, no entanto, que a maioria das células epiteliais não apresentava bactérias associadas.



**Figura 3** - Tecido epitelial da cisterna da glândula mamária com uma (3.a.) ou mais (3.b.) bactérias aderentes ao polo apical de células epiteliais.

Foram contadas 500 células em cada lâmina, num total de duas lâminas por animal. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 22.

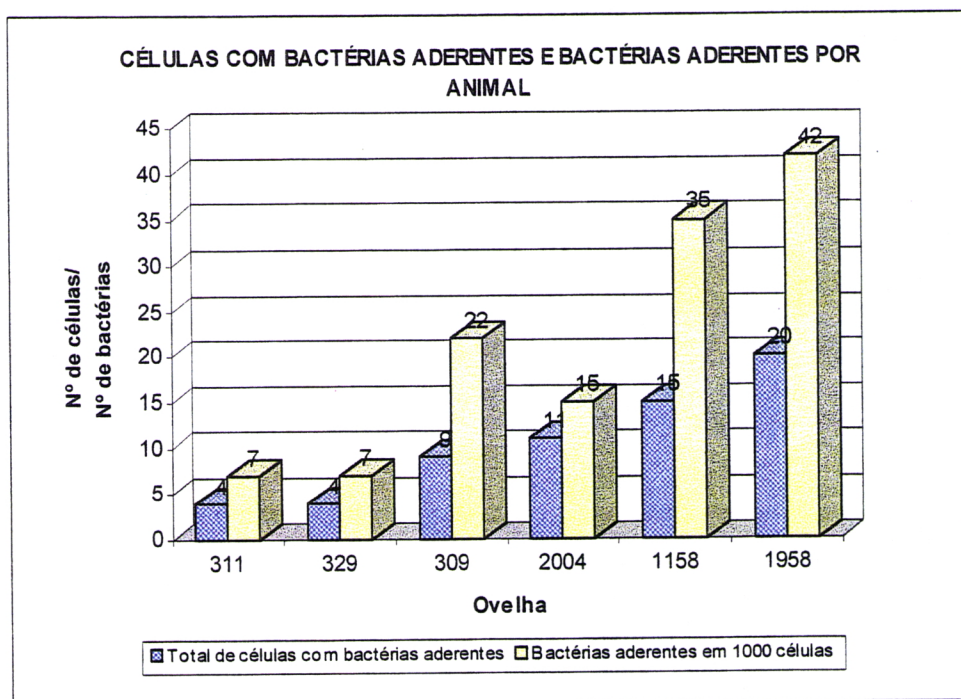
Animal		Células com bactérias aderentes			Bactérias aderentes		
					total em 1000 células	por célula epitelial	
Grupo	Nº	total	média	desvio padrão		média	desvio padrão
<b>11ZB</b>	311	4	0,00	0,06	7	0,01	0,12
	329	4	0,00	0,04	7	0,00	0,10
<b>22ZM</b>	309	9	0,01	0,09	22	0,02	0,28
	2004	11	0,01	0,10	15	0,02	0,15
<b>33CO</b>	1158	15	0,02	0,12	35	0,04	0,33
	1958	20	0,02	0,14	42	0,04	0,31

**Tabela 22** - Resultados do ensaio de adesão a tecido epitelial. Número de células com bactérias aderentes e número de bactérias aderentes por célula, para cada animal de cada grupo.

No grupo 11ZB, foram observadas 4 células com bactérias aderentes em cada animal em estudo. No grupo 22ZM, registaram-se 9 células com bactérias aderentes na ovelha 309 e 11 na 2004. No grupo 33CO, na ovelha 1158 foram observadas 15 células com bactérias aderentes e na 1958 20 células.

No que se refere ao número de bactérias aderentes por célula, observou-se um total de 7 bactérias aderentes em cada um dos animais pertencentes ao grupo 11ZB. No grupo 22ZM encontraram-se 22 bactérias aderentes às células da ovelha 309 e 15 na 2004. Finalmente, no grupo controlo, as células da ovelha 1158 tinham 35 bactérias aderentes e nas da ovelha 1958 encontraram-se 42 bactérias.

O gráfico 9 resume os resultados acima descritos em termos individuais.



**Gráfico 9** - Adesão de *S. xylosus* a tecido epitelial. Número de células com bactérias aderentes e número de bactérias aderentes por animal.

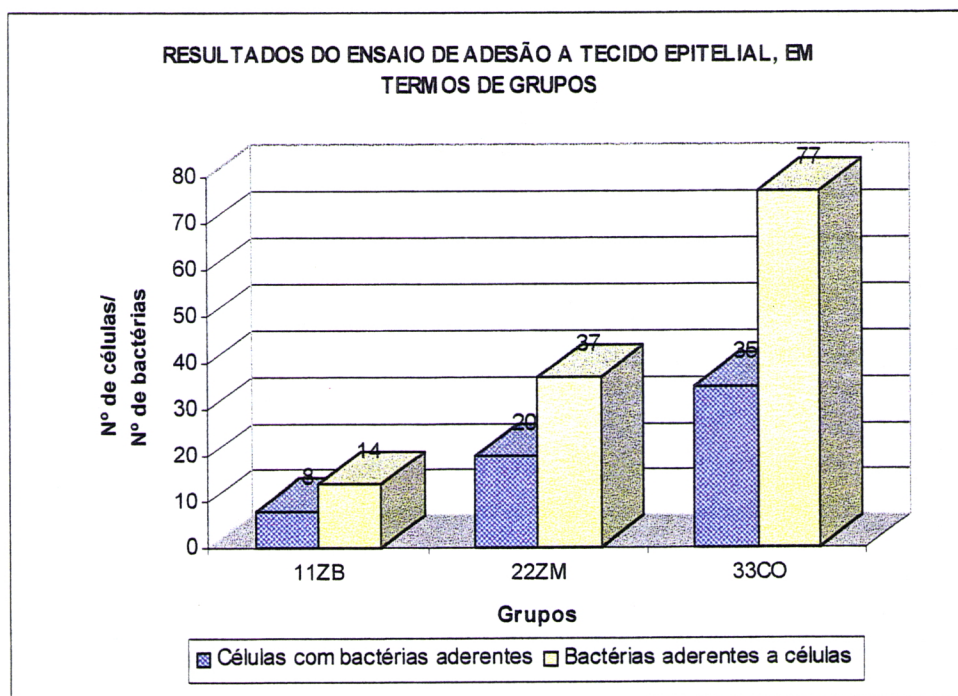
A tabela 23 mostra os resultados obtidos para os vários grupos.

Grupo	Células com bactérias aderentes			Bactérias aderentes		
	total	média	desvio padrão	total	por célula epitelial	
					média	desvio padrão
<b>11ZB</b>	8	0,00	0,05	14	0,01	0,11
<b>22ZM</b>	20	0,01	0,10	37	0,02	0,23
<b>33CO</b>	35	0,02	0,13	77	0,04	0,32

**Tabela 23** - Resultados do ensaio de adesão a tecido epitelial para cada grupo. Número médio de células com bactérias aderentes e de bactérias aderentes a células epiteliais em cada grupo.

O grupo 11ZB foi aquele em que se observou um menor número de células com bactérias aderentes, bem como um menor número de bactérias aderentes às células. Valores intermédios foram registados no grupo 22ZM, com 20 células com bactérias aderentes e um total de 37 bactérias aderentes a células epiteliais. No grupo controlo (33CO) foram contadas 35 células com bactérias a elas aderentes, tendo o total de bactérias sido de 77.

Seguem-se os resultados obtidos para os três grupos, sob a forma de gráfico.



**Gráfico 10** - Valores médios de adesão de *S. xylosus* a tecido epitelial observados em cada grupo. Número de células com bactérias aderentes e número de bactérias aderentes por grupo.

#### 5.4. Validação estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios de adesão baseou-se na determinação da fracção atribuível (FA) de redução de adesão bacteriana a células epiteliais devida aos diferentes tratamentos a que os 3 grupos em estudo foram sujeitos e no *odds ratio* (OR) de adesão bacteriana. Utilizou-se um intervalo de confiança de 95%.

Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Epi Info.

##### 5.4.1. Ensaio de adesão a células epiteliais dispersas

Quando comparamos o grupo 11ZB com o grupo 33CO, verifica-se que a fracção atribuível de não adesão devido à suplementação em zinco biodisponível é de 66,6%, sendo o *odds ratio* adesão de 0,331

( $0,19 < OR < 0,58$ ), com um nível de significância muito elevado ( $p=0,000026$ ,  $\chi^2=17,69$ ).

Comparando os resultados de adesão bacteriana a células epiteliais no grupo que recebeu um suplemento alimentar de zinco mineral com o grupo controlo, observa-se que as diferenças encontradas não são significativas ( $p=0,05333852$ ,  $\chi^2=3,73$ ). A fracção de protecção contra a adesão atribuível ao zinco mineral é de 41,9%, sendo o *odds ratio* de 0,581 ( $0,32 < OR < 1,05$ ).

Quando se comparam os dois tipos de suplementação - zinco biodisponível e zinco mineral, verifica-se que diferem significativamente entre si ( $p=0,0193595$ ,  $\chi^2=5,47$ ). O facto de se suplementar a dieta com zinco biodisponível em vez de se utilizar zinco mineral reduz a adesão bacteriana a células epiteliais em 42,6%, sendo o *odds ratio* de adesão para os animais do grupo 22ZM de 0,5741 ( $0,35 < OR < 0,94$ ).

#### **5.4.2. Ensaio de adesão a células epiteliais previamente fixadas**

A redução da adesão bacteriana a células epiteliais previamente fixadas pertencentes a ovelhas do grupo 11ZB, quando comparada com o grupo 33CO, atribuível ao suplemento de zinco biodisponível adicionado à ração é de 71,7%. Esta FA é muito significativa ( $p=0,0000$ ,  $\chi^2=34,32$ ), sendo *odds ratio* de adesão de 0,281 ( $0,18 < OR < 0,41$ ).

Quando se comparam os grupos 22ZM e 33Co, observa-se que a fracção de não adesão atribuível ao zinco mineral é de 25,9%, valor não significativo ( $p=0,0925137$ ,  $\chi^2=2,83$ ). O *odds ratio* de adesão é de 0,741 ( $0,51 < OR < 1,07$ ).

A suplementação da dieta com zinco biodisponível em vez de zinco mineral traduz-se numa redução de adesão bacteriana a células epiteliais previamente fixadas de 61,8%, estatisticamente significativa ( $p=0,0000192$ ,  $\chi^2=18,26$ ). O *odds ratio* de adesão no grupo 11ZB, quando comparado com o 22ZM é de 0,281 ( $0,18 < OR < 0,45$ ).

### 5.4.3. Ensaio de adesão a tecido epitelial da cisterna mamária

Analisando o efeito do zinco biodisponível, quando comparado com a ausência de suplementação alimentar em zinco, acontece uma redução de 77,5% na adesão bacteriana a tecido epitelial da cisterna da glândula mamária. A fracção atribuível ao zinco biodisponível na diminuição da adesão é muito significativa ( $p=0,0000348$ ,  $\chi^2=17,13$ ). O *odds ratio* de adesão é de 0,23 ( $0,10 < OR < 0,51$ ).

Comparando o efeito da suplementação da dieta com zinco mineral com a ausência de suplementação, as diferenças são pouco significativas ( $p=0,0417107$ ,  $\chi^2=4,15$ ). A fracção de protecção atribuível ao tratamento é de 43,3%, sendo o OR de 0,57 ( $0,31 < OR < 1,02$ ).

A administração de zinco biodisponível na ração comparada com o fornecimento de zinco mineral tem um efeito protector estatisticamente significativo ( $p=0,0228771$ ,  $\chi^2=5,18$ ). A redução da adesão é de 60,2% no grupo 11ZB em relação ao 22ZM, sendo o OR de 0,40 ( $0,16 < OR < 0,95$ ).

## 5.5. Discussão

Encontram-se descritos na literatura disponível vários métodos para estudar a adesão bacteriana a células epiteliais, tanto *in vivo* como *in vitro*. Na generalidade dos ensaios foram utilizadas estirpes de *Staphylococcus aureus*, tendo estes sido realizados sobretudo com bovinos leiteiros (Wanasinghe, 1981a, Opdebeeck *et al.*, 1988, Olmsted e Norcross, 1992, Cifrian *et al.*, 1994, Cifrian *et al.*, 1996).

No presente trabalho optámos pela utilização de *Staphylococcus xylosus* nos ensaios de adesão bacteriana uma vez que foi esta a estirpe

bacteriana mais frequentemente isolada na exploração em estudo - 22 casos de infecção no rastreio preliminar realizado ao efectivo (cf. Cap 2, 2.3.3.1.).

O *Staphylococcus xylosus* é uma bactéria Gram positiva, de forma esférica, com 0,8 a 1,2 $\mu$ m de diâmetro. Pode apresentar várias organizações espaciais: ou aos pares ou como células isoladas, por vezes formando tétradas. Estas bactérias encontram-se frequentemente na pele de vários mamíferos, tendo também sido isoladas no solo e na água.

Esta espécie bacteriana é anaeróbia facultativa, crescendo, no entanto, melhor em aerobiose e realizando principalmente metabolismo respiratório (Sneath *et al.*, 1986).

Embora esteja descrita a utilização de bactérias marcadas radioactivamente, não nos pareceu necessário recorrer a tal metodologia que tem implicações a nível ambiental, nomeadamente em termos de resíduos poluentes. Por isso, optámos por utilizar uma coloração que permitisse observar e distinguir as células epiteliais e as bactérias a elas aderentes. Como a espécie bacteriana utilizada é Gram positiva e as células epiteliais coram com fucsina básica, utilizámos a coloração de Gram. Tal procedimento permite evitar os inconvenientes da marcação radioactiva atrás referidos e possibilita a obtenção de resultados satisfatórios, uma vez que permite a observação e a fácil distinção das bactérias aderentes às células.

Ensaio de adesão *in vivo* incluem a observação de situações de doença natural ou induzida experimentalmente (Anderson, 1978, Gudding *et al.*, 1984). Ensaio *in vitro* foram realizados utilizando de culturas primárias de epitélio mamário de bovino (Cifrian *et al.*, 1996), ovino (Iturralde *et al.*, 1993) ou de coelho (Kraehenbul, 1977), linhas celulares (Opdebeeck *et al.*, 1988, Cifrian *et al.*, 1994) ou células em suspensão, isoladas, quer directamente da glândula mamária (Amorena *et al.*, 1990), quer a partir do leite, quer por via enzimática (Kraehenbuhl, 1977).

Se a realização de ensaios *in vivo* permite observar a adesão tal como ela realmente ocorre no estabelecimento de infecção, apresenta

inconvenientes, sobretudo de natureza económica, uma vez que a produtividade dos animais é afectada e, na generalidade dos casos, os animais assim infectados são sacrificados, de modo possibilitar a observação da adesão às células epiteliais.

A utilização de modelos experimentais, em que são induzidas mamites com agentes patogénicos isolados noutra espécie animal, pode conduzir a resultados não correspondentes ao que ocorre na espécie em estudo. Essa divergência pode resultar de diferenças ao nível dos mecanismos de infecção entre a espécie em que foi isolado o agente etiológico e aquela em que se realiza o ensaio. Por essa razão, realizámos os nossos ensaios *in vitro*, embora sabendo que nem sempre é possível reproduzir o que ocorre *in vivo*. No entanto, aquele tipo de ensaio de adesão é de mais fácil execução, para além de implicar geralmente menores encargos e permitir realizar um maior número de réplicas.

Um dos modos possíveis de estudar a adesão *in vitro* consiste no recurso a células epiteliais, que podem ser obtidas de várias formas, nomeadamente a partir do leite, por centrifugação em gradiente de densidade. Este procedimento tem o inconveniente da existência de contaminações por outros tipos de células, sobretudo macrófagos, o que poderá alterar os resultados.

A utilização de linhas celulares também apresenta inconvenientes, nomeadamente no que se refere à ocorrência de alterações na composição da membrana, o que poderá conduzir a resultados não concordantes com a realidade. A utilização de linhas celulares obtidas por cultura de células pertencentes a outra espécie animal também é susceptível de provocar variação a nível dos resultados obtidos, decorrentes, tal como na realização dos ensaios *in vivo* acima mencionados, do facto de os receptores membranares diferirem de espécie para espécie.

Em ensaios de adesão realizados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* a células epiteliais da glândula mamária de bovinos Opdebeeck *et al.* (1988) observaram que a adesão a células em suspensão era significativamente superior ao que ocorria em células mantidas em cultura.



O recurso à raspagem da glândula mamária, quer em animais vivos (Amorena *et al.*, 1990), quer recorrendo ao seu sacrifício, recolhendo as glândulas mamárias para obter as células (Wanasinghe, 1981a, Olmsted e Norcross, 1992, Iturralde *et al.*, 1993) é outra das metodologias possíveis para a obtenção de células epiteliais.

A avaliação da adesão bacteriana a células epiteliais foi efectuada recorrendo a três técnicas diferentes: adesão a células epiteliais em suspensão, adesão a células epiteliais previamente fixadas e adesão a tecido epitelial da cisterna da glândula mamária.

As células epiteliais necessárias à realização das duas primeiras técnicas foram obtidas por raspagem suave da cisterna da glândula mamária, com as quais preparámos uma suspensão titulada que foi incubada com uma suspensão bacteriana. No terceiro tipo de estudo procedemos ao corte de uma amostra de tecido epitelial, também incubada com a suspensão bacteriana.

Nas três métodos utilizados procedemos à eliminação das bactérias não aderentes, uma vez que, de acordo com Olmsted e Norcross (1992), a eliminação das bactérias não aderentes constitui um passo crítico nos ensaios de adesão a células epiteliais. A dispersão de agregados bacterianos e a eliminação cuidadosa de bactérias são factores críticos para resultados consistentes. Gudding *et al.* (1984), num estudo sobre a patogenia da mamite devida a *Staphylococcus aureus*, verificaram que após várias lavagens dos tecidos, ainda se encontravam presentes bactérias, sugerindo que ocorreu uma adesão específica. Tal procedimento foi por nós seguido, sugerindo que o mesmo ocorreu nos nossos ensaios.

Quando comparamos os ensaios de adesão a células em suspensão e a células previamente fixadas, observámos diferenças, tanto no número de células com bactérias aderentes como no número de bactérias aderentes às células. Julgamos que as diferenças dos resultados nestes dois tipos de ensaio se podem dever ao facto de, no caso das células previamente fixadas, haver uma menor superfície disponível para a adesão bacteriana.

No caso das células em suspensão, tal não se verificou, tendo sido observadas células isoladas com bactérias aderentes. Tal facto pode explicar as diferenças no número de bactérias aderentes encontrado em cada um destes ensaios.

As diferenças encontradas poderão ainda dever-se a alterações a nível da membrana celular, resultantes do processo de fixação, com repercussões a nível da adesão bacteriana. Num trabalho sobre a influência da fase do ciclo éstrico na adesão de *Streptococcus zooepidemicus* a endométrio de equino, Ferreira-Dias *et al.* (1994) verificaram a presença de um grande número de células epiteliais com bactérias aderentes a elas quando não estavam ligadas à membrana basal. Este aumento na adesão pode ser atribuído à maior superfície celular exposta ou a alterações de receptores.

O terceiro método, em que se prepararam cortes histológicos de tecido epitelial da cisterna da glândula mamária, é, quanto a nós, o que melhor reproduz o que ocorre *in vivo*. Neste caso, apenas se encontra exposto o polo apical das células epiteliais, tal como acontece na glândula mamária do animal vivo, só se verificando adesão bacteriana a essa superfície celular. Por esse motivo, o número de células com bactérias aderentes e o número de bactérias que adere a cada célula, é substancialmente menor, quando comparado com os outros dois métodos em estudo.

O número de células com bactérias aderentes contadas nas preparações microscópicas realizadas diferiu nos três métodos. Quando testámos a adesão a células epiteliais em suspensão, verificámos que as células se encontravam dispersas pela lâmina. Na adesão a células previamente fixadas a densidade celular por campo óptico era muito mais elevada, ocorrendo, como acima referimos, a formação de agregados, o que dificultou a contagem. Assim, contámos um maior número de células - 200 animal -, de modo a diminuir a margem de erro. No ensaio de adesão a tecido epitelial, como apenas se verificou adesão ao polo apical e como o

numero de células por campo óptico ainda era maior, contámos 1000 células por animal, também para reduzir o erro de amostragem.

O método em que foi avaliada a adesão a tecido epitelial da cisterna da glândula mamária é aquele que mais se parece aproximar do que acontece *in vivo*. Parece-nos, assim, preferível recorrer a este tipo de procedimento para realizar os ensaios de adesão. Embora as duas primeiras técnicas, especialmente aquela em que se utilizaram células previamente fixadas, mostrem a mesma tendência que aquele, apresentam, contudo, uma maior margem de erro.

Nos dois primeiros métodos, em que se testou a adesão a células epiteliais em suspensão e previamente fixadas, é possível que ocorra tanto adesão específica, mediada por receptores celulares, como adesão não específica, às superfícies basolaterais da célula epitelial. Assim, verifica-se que tanto o número de células com bactérias aderentes como de bactérias que aderem a cada célula é mais elevado nestes ensaios que no ensaio de adesão a tecido epitelial.

No terceiro método, em que se prepararam cortes histológicos de tecido epitelial da cisterna da glândula mamária, é mais provável que tenha ocorrido adesão específica a receptores celulares, uma vez que só se observou adesão ao polo apical da células epiteliais, onde se localizam os receptores celulares de adesão. Por isso, o número de células com bactérias aderentes e o número de bactérias que adere a cada célula, foi substancialmente menor, quando comparado com os outros dois métodos em estudo.

Com os três métodos utilizados no estudo da adesão bacteriana verificámos a presença de mais de uma bactéria aderente a cada célula epitelial. Esta observação pode resultar de características inerentes à espécie bacteriana utilizada nos ensaios de adesão e não de uma multiplicação bacteriana. De facto, as bactérias desta espécie encontram-se frequentemente associadas em pares e por vezes tétradas (Sneath *et al.*, 1986), além de que as condições de incubação em que se realizaram os ensaios (4°C) não são favoráveis ao crescimento bacteriano.

As variações individuais observadas entre animais amostrados dentro de cada grupo poderão ser atribuídas a diferentes estados fisiológicos no momento da recolha das células (Guidry *et al.*, 1976), uma vez que algumas das ovelhas se encontravam em gestação. As diferenças individuais observadas poderão ainda ser inerentes ao próprio animal. Em bovinos leiteiros, foram observadas diferenças na susceptibilidade da infecção intramamária entre vacas e entre quartos de cada glândula mamária (Schalm *et al.*, 1971 *apud* Paape *et al.*, 1978) (cf. Cap 4, 4.5.)

Os resultados obtidos no presente ensaio sugerem a existência de uma relação entre a administração de zinco e a redução da adesão bacteriana a células epiteliais da cisterna da glândula mamária. Com os três tipos de métodos efectuados constatámos que nos grupos em cuja alimentação foi incorporado zinco se verificou uma menor taxa de adesão que no grupo controlo. Entre os dois grupos que receberam zinco na ração, a adesão foi menor no 11ZB que no 22ZM, ou seja, o zinco biodisponível foi mais eficiente na redução da adesão bacteriana que o zinco mineral: no grupo que recebeu zinco biodisponível na ração verificam-se reduções na adesão bacteriana atribuíveis à alimentação variando entre os 66,6 e 77,5%, dependendo da forma como foi realizado o ensaio. Quando comparamos o grupo que recebeu zinco mineral com o controlo, observa-se que a fracção da redução da adesão bacteriana a células epiteliais desce para valores de 25,9 a 43,3%, pouco significativos em termos estatísticos.

A comparação das duas formas de suplementação em zinco sugere que a combinação utilizada na grupo 11ZB é mais eficiente na redução da adesão bacteriana ao epitélio da glândula mamária, observando-se fracções de redução atribuíveis ao zinco biodisponível entre os 42,6 e os 60,2% nos diferentes ensaios, diferenças estas estatisticamente significativas.

Numa fase posterior, pensamos ser preferível realizar biópsias de tecido epitelial da cisterna da glândula mamária, tal como descrito por Ferreira-Dias *et al.* (1994) para tecido uterino. Este modo de obtenção de tecido epitelial é preferível em termos económicos pois, para além de não implicar o sacrifício dos animais, torna também viável a recolha de uma

maior número de amostras para estudo, possibilitando uma redução da margem de erro. Pode, no entanto, ter o inconveniente de provocar lesões na glândula mamária ou mesmo desencadear um processo mamítico de origem mecânica.

## **6. DISCUSSÃO GERAL**

Na Herdade da Abóbada, exploração onde foram conduzidos os ensaios realizados, o efectivo ovino é composto por várias raças, autóctones e exóticas, cujo leite é utilizado na produção de um recurso de origem biológica - queijo de Serpa (denominação de origem). Este produto artesanal, exclusivamente produzido na zona de Serpa, é importante para a economia da região na qual a exploração em estudo se insere.

O presente trabalho envolveu a formação de três grupos de ovelhas que receberam dietas diferentes: suplementação com 50% de zinco biodisponível e 50% de zinco mineral; suplementação com zinco mineral e ausência de suplementação. Antes da formação destes grupos foi efectuado um rastreio preliminar a todo o efectivo leiteiro, de modo a avaliar o seu estado higiossanitário antes do início do ensaio, tendo sido realizados rastreios mensais ao longo do ensaio com o objectivo de determinar a incidência de infecções em cada um dos grupos em estudo.

A presença de infecção ao nível da glândula mamária, principalmente sob a forma subclínica, traduz-se na redução da quantidade de leite produzido pelos animais infectados, bem como nas suas qualidades. Esta forma de infecção, em que aparentemente os animais não estão doentes, pode contribuir para a sua disseminação no rebanho, com consequências produtivas e económicas nefastas para a exploração. Torna-se, pois, importante actuar a nível da prevenção do aparecimento de novas infecções, de modo a manter um bom nível higiossanitário do efectivo.

A defesa do organismo face à infecção assenta em três tipos de mecanismos. A primeira linha de defesa contra agentes patogénicos são as barreiras naturais do organismo, como a motilidade intestinal, o pH, os cílios respiratórios, o revestimento cutâneo. A nível da glândula mamária, a estrutura do canal do teto (Nickerson, 1985), a presença do revestimento do epitélio com queratina (Craven e Williams, 1985, Bitman *et al.*, 1991) e a própria ordenha (Craven e Williams, 1985) constituem os mecanismos iniciais de defesa contra a infecção.

Se os microorganismos forem capazes de ultrapassar as barreiras naturais de defesa, o organismo desencadeia mecanismos inespecíficos de

defesa, como a fagocitose, a activação da cascata do complemento ou, no caso de vírus, o interferon  $\gamma$ .

Quando os mecanismos específicos são ultrapassados, é desencadeada a resposta imune específica por anticorpos ou células T.

Uma das formas de agir a nível preventivo, evitando o estabelecimento de infecção e todos os prejuízos que daí advêm, quer para o animal, quer em termos económicos, reside no recurso à suplementação da dieta com nutrientes capazes de contribuir para a defesa da glândula mamária. Em trabalhos realizados com bovinos leiteiros (Spain, 1993) verificou-se que o zinco contribuía para a integridade celular e manutenção das defesas da glândula mamária, diminuindo a incidência de novas infecções. Por esse motivo, realizamos ensaios que nos permitissem observar se o mesmo se verificava em ovinos e a que nível da defesa da glândula mamária o efeito do zinco se fazia sentir: se a nível da adesão bacteriana a células epiteliais, se a nível das funções de neutrófilos.

Analisámos também a incidência de novas infecções e a possível influência do zinco sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos susceptíveis de poderem ser afectados pela presença deste oligoelemento.

A forma como o zinco é incorporado na dieta é importante para a eficácia da sua acção. Quando este oligoelemento se encontra sob a forma de proteinato é mais facilmente absorvido e a sua acção mais eficiente do que se for fornecido sob a forma mineral convencional de sulfato de zinco (Vandergrift, 1993). O recurso ao proteinato permite reduzir a quantidade de zinco incorporada na ração e também a quantidade excretada pelo animal, contribuindo para a redução da poluição com sulfato de zinco (Lowe, 1993).

No entanto, dado que a utilização conjunta de proteínatos e zinco mineral mostrou ser a forma mais equilibrada e eficiente (Vandergrift, 1993), para além de mais vantajosa em termos económicos, recorreremos à suplementação da dieta com 50% de Bioplex Zn e 50% de sulfato de zinco.

Esta forma de suplementação foi testada face a uma alimentação convencional, sem qualquer tipo de suplementação em zinco, que funcionou como controlo, e ainda face à suplementação com uma forma mineral daquele oligoelemento - o sulfato de zinco.



O presente trabalho foi levado a cabo num rebanho sujeito a condições próximo do óptimo. A escolha do efectivo teve como base o facto de termos julgado ser necessário respeitar determinados requisitos, não só a nível do cumprimento da dieta estabelecida para os diferentes grupos, mas também em termos de manejo e sanidade do efectivo.

Tratando-se de um estudo preliminar, é, em nosso entender, necessário que se reunam e respeitem regras de manejo, higiene e sanidade, de modo a podermos determinar, não só o papel do zinco como o da sua apresentação no aparecimento de novas infecções intramamárias, como também a melhor metodologia a seguir na avaliação do efeito daquele oligoelemento. Deste modo, a manutenção rigorosa dos grupos, do fornecimento da alimentação testada em cada um deles e o cumprimento das regras gerais de manejo foi indispensável à consecução e obtenção de resultados neste estudo.

A formação dos grupos de ovelhas incluídas no ensaio não foi totalmente aleatória, tendo sido consequência da restrição imposta quanto à presença de mamite clínica, uma vez que o efeito do zinco se faz sentir a nível da prevenção, não tendo efeito curativo sobre as infecções intramamárias. A inclusão de animais doentes poderia, pois, falsear os resultados obtidos. Assim, foram incluídos nos três grupos animais pertencentes às várias raças que compõem o efectivo e isentos de mamite clínica, embora alguns tivessem revelado resultado positivo no TCM realizado antes do início do ensaio.

De modo a determinar a possível interferência da suplementação da dieta com zinco sobre o normal funcionamento do organismo, realizámos análises de vários parâmetros bioquímicos e celulares sanguíneos.

Os resultados destas análises sugerem que a administração de zinco biodisponível na ração, quando comparada com a ausência de suplementação, não induz alterações significativas da maioria dos parâmetros analisados, o mesmo sucedendo com o zinco mineral. Embora tenham ocorrido variações individuais dentro dos grupos, não se observam diferenças significativas quando se comparam os resultados médios dos três

grupos, o que leva a crer que a suplementação da dieta com zinco não interfere no normal funcionamento do organismo.

Se bem que sejam observadas variações individuais entre as ovelhas amostradas dentro de cada grupo, também não se observam diferenças apreciáveis no que respeita à composição da fracção celular do sangue. É, assim, de supor que a administração do zinco biodisponível, não provoca alterações nas células sanguíneas das ovelhas.

Também a nível reprodutivo, a dose de zinco, tanto biodisponível como mineral, não provocou alterações. Os partos das ovelhas que ficaram gestantes durante o ensaio decorreram na época normal (Agosto-Setembro), o que sugere que as doses administradas não causaram manifestações tóxicas, não parecendo ter tido interferência no normal decurso da gestação.

Para avaliar o efeito da suplementação da dieta com zinco analisámos a taxa de infecções intramamárias nos três grupos em estudo. No final do ensaio, verificou-se que as incidências de infecção eram muito baixas, pelo que não podemos concluir qual o efeito da administração de zinco como suplemento alimentar.

O facto de a taxa de incidência de mamites no efectivo em estudo ser baixa pode também ter resultado do facto de serem praticadas medidas básicas de higiene durante a ordenha, com o objectivo de prevenir a infecção. Assim, em trabalhos futuros deverão ser realizados ensaios em rebanhos com outros tipos de manejo, de forma a determinar o possível papel do zinco prevenção do aparecimento de novas infecções.

Quando ocorre uma infecção em qualquer lugar do organismo, os neutrófilos são atraídos até esse local de modo a destruírem o organismo patogénico responsável pela infecção. Como a glândula mamária é um sistema aberto, onde a entrada dos microorganismos através do canal do teto é relativamente fácil durante a ordenha, é frequente a presença de neutrófilos residentes na glândula, de modo a rapidamente eliminarem os agentes patogénicos. No entanto, a capacidade fagocitária destes polimorfonucleares encontra-se diminuída devido ao facto de se encontrarem ingurgitados com glóbulos de caseína e de gordura (Paape *et al.*, 1979, Nickerson, 1985).

Dado que a fagocitose é um importante mecanismo de defesa do organismo contra a infecção, e da glândula mamária em particular, avaliámos o efeito do zinco a nível da capacidade fagocitária de neutrófilos. Neste ensaio utilizámos neutrófilos circulantes em vez de neutrófilos presentes na glândula mamária devido ao facto acima exposto, isto é, o conhecimento da redução da sua capacidade de resposta fagocitária.

Verificámos que no grupo 11ZB, cuja ração foi suplementada com zinco biodisponível, o nível de fagocitose foi menor, tendo-se-lhe seguido o grupo 22ZM, que recebeu zinco mineral incorporado na ração. O grupo 33CO, que não recebeu qualquer suplemento alimentar de zinco, foi aquele que mostrou valores mais elevados de fagocitose.

As diferenças encontradas entre o grupo 11ZB e 33CO sugerem que o zinco biodisponível, por ser mais facilmente absorvido a nível intestinal que as formas minerais, tem um efeito mais evidente sobre os neutrófilos. No entanto, quando se compararam as duas formas de suplementação da dieta com zinco não se verificaram diferenças significativas, o que poderá confirmar o facto acima mencionado.

Embora tenham ocorrido variações individuais consideráveis em todos os grupos em estudo, os resultados obtidos sugerem que a administração de zinco na alimentação, sob qualquer das formas testadas, reduz a capacidade fagocitária dos neutrófilos. Tais resultados estão de acordo com os de Sugarman (1983), que verificou a diminuição da capacidade de fagocitose de partículas de latex quando era administrado zinco na alimentação. Este autor atribui o efeito negativo do zinco ao facto de este metal contribuir para a estabilização das membranas celulares, impedindo ou dificultando a formação de pseudópodes durante o processo de fagocitose.

A ocorrência de uma redução da capacidade fagocitária nos neutrófilos circulantes leva-nos a considerar que o mesmo acontece aos que fazem parte da população de PMNs residentes na glândula mamária, uma vez que estes migraram dos vasos sanguíneos para aí.

Em trabalhos futuros poderá ser investigada a possível influência do zinco sobre outras funções de neutrófilos, como a quimiotaxia ou a morte intracelular.

Para poderem provocar uma infecção da glândula mamária, os microorganismos têm que ultrapassar uma série de barreiras. Inicialmente têm que penetrar através do esfíncter que fecha a abertura do teto, ultrapassar a barreira de queratina que reveste o canal do teto e resistir ao arrastamento pelo leite durante a ordenha. Se conseguirem transpor todas estas barreiras, para provocar infecção deverão, segundo a maioria dos autores, (Frost, 1975, Wanasinghe, 1981b, Amorena *et al.*, 1990), ser capazes de aderir às células epiteliais, embora Anderson (1978) refira que tal não é essencial para o desencadear de infecção.

A colonização e posterior infecção da glândula mamária é facilitada pela adesão bacteriana às células epiteliais (Wanasinghe, 1981a, Aly e Levit, 1987, Isberg, 1991, Ofek e Beachey, 1980 *apud* Olmsted e Norcross, 1992, Amorena *et al.*, 1990), pelo que a intervenção a este nível, evitando a fixação dos microbianos, será um dos mecanismos de prevenção de novas infecções.

Com os três métodos testados foram observadas diferenças estatisticamente significativas na redução da adesão bacteriana entre o grupo cuja dieta foi suplementada com zinco biodisponível e o grupo controlo. Estes resultados sugerem que aquela forma de administração do zinco é susceptível de reduzir a adesão bacteriana às células do epitélio da glândula mamária, agindo como factor de protecção.

No grupo cuja ração foi suplementada com zinco mineral verificaram-se valores de adesão intermédios entre os do grupo do zinco biodisponível e do grupo controlo. Este facto sugere que aquela forma de administração de suplementação em zinco, se bem que promova a redução da adesão, quando comparada com o controlo, não é tão eficaz na prevenção da adesão bacteriana como o zinco biodisponível.

Embora tenham apenas sido realizados ensaios de adesão com células de dois animais de cada grupo, o número de células amostradas em cada um foi elevado, o que reduz a margem de erro na avaliação do papel



do zinco, e da sua forma de administração na alimentação, a nível da adesão bacteriana a células epiteliais.

Em trabalhos futuros será importante confirmar estes resultados numa amostragem de maiores dimensões, utilizando outras técnicas, como por exemplo biópsias, que evitam o sacrifício dos animais.

A nível das defesas da glândula mamária por nós avaliadas, os resultados da administração de zinco parecem ser contraditórios. Na realidade, se, por um lado este oligoelemento reduz a adesão bacteriana às células epiteliais da glândula mamária, por outro ele diminui a capacidade fagocitária dos neutrófilos. Estes factos colocam-nos face ao problema de preconizar a administração de zinco biodisponível, sabendo que vai ter como resultado uma diminuição da adesão bacteriana ao epitélio da glândula mamária, ou optar por não fornecer nenhum suplemento alimentar de zinco, de modo a não afectar a eficiência dos neutrófilos na fagocitose.

Quando pesquisámos a influência do zinco ao nível da adesão, verificámos que foi o grupo que recebeu uma dieta suplementada com zinco biodisponível que mostrou menores níveis de adesão em todos os tipos de ensaio realizados. O zinco mineral também reduziu a adesão bacteriana, quando comparado com o grupo controlo, no entanto, foi menos eficaz que o zinco biodisponível.

Assim, em termos de eficácia na prevenção de novas infecções será preferível administrar zinco na alimentação e, deste modo, se não evitar, pelo menos reduzir, a adesão bacteriana às células epiteliais da glândula mamária, uma vez que deste modo se dificulta o estabelecimento de infecção, minorando a necessidade de intervenção dos neutrófilos. Para além disso, como os neutrófilos residentes na glândula mamária, por já terem se encontrarem repletos de caseína e lípidos, são menos eficientes quando comparados com os neutrófilos circulantes, devemos considerar prioritário actuar ao nível da adesão bacteriana na prevenção das mamites. De facto, se a capacidade fagocitária está de qualquer modo reduzida, independentemente da suplementação da dieta com zinco, será preferível evitar o estabelecimento da infecção em vez de actuar ao nível de mecanismos inespecíficos de defesa, como é o caso da fagocitose.

Em termos de forma de administração do zinco, julgamos preferível utilizar zinco biodisponível em vez de zinco mineral, uma vez que os resultados obtidos nos ensaios de adesão bacteriana sugerem que aquela forma de zinco é mais eficaz na redução da adesão que o zinco mineral.

Uma vez que, segundo a bibliografia (Vandergrift, 1993), a utilização isolada de Bioplex Zn parece não ser tão eficiente como a utilização de uma fracção de zinco biodisponível e outra de zinco mineral, importa, em trabalhos futuros, verificar esse facto, analisando a relação de custo/benefício que daí advém. O recurso a formas biodisponíveis, em detrimento das minerais, apresenta ainda vantagens em termos ambientais, uma vez que são eliminadas em menores quantidades pelos animais, e sob uma forma capaz de ser incorporada nos ciclos biológicos da Natureza.

Os resultados dos nossos ensaios sugerem que o recurso à suplementação da dieta com zinco biodisponível como forma de prevenção do aparecimento de novas infecções é uma alternativa a considerar em relação ao tratamento, quando a infecção se declara, tanto mais que os casos de mamite subclínica passam frequentemente despercebidos. Para além disso, em termos de qualidade dos produtos finais - leite e queijo -, objectivos, em última análise, do produtor, a suplementação da dieta com zinco biodisponível não parece ter repercussões, o mesmo não se verificando com os fármacos utilizados no tratamento de mamites. Assim, julgamos ser preferível actuar a nível profiláctico, evitando o recurso à terapêutica e os custos que ela implica para o animal e para o produtor.

## **BIBLIOGRAFIA**

- AA. VV., 1994. Zone diameter interpretative standards and equivalent minimum inhibitory concentration (MIC) breakpoints for organisms other than *Haemophilus sp.*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Streptococcus pneumoniae*, *N C C S*, **14** (16).
- Abraham, S. M., Beachey, E. H. e Simpson W. A., 1983. Adherence of *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* to fibronectin-coated and uncoated epithelial cells. *Infect Immun*, **41** (3): 1261-1268.
- Aly, R. e Levit, S., 1987. Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. *Rev Infect Dis*, **9** (suppl. 4): S341-S350.
- Amorena, B., Balsega, R. e Aguilar, B., 1990. Factors influencing the degree of *in vitro* bacterial adhesion to ovine mammary gland epithelial cells. *Vet Microbiol*, **24** (1): 43-53.
- Anderson, J. C., 1978. Absence of bacterial adherence in establishment of experimental mastitis in mice. *Vet Pathol*, (15): 770-775.
- Anderson, J. C., 1982. Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note of control, immunisation and therapy. *Vet Rec*, **110** (16): 372-376.
- Bar-Or, Y., 1990. The effect of adhesion on survival and growth of microorganisms. *Experientia*, **46**: 823-826.
- Beachey, E. H., 1981. Bacterial adherence: adhesion receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis*, **143**: 325-245.
- Benjamin, M. M., 1984. Manual de patología clínica en veterinaria. 1ª Ed., Editorial Limusa, México.
- Bitman, J., Wood, D. L., Bright, S. A., Miller, R. H., Capuco, A. V., Roche, A. e Pankey, J. W., 1991. Lipid composition of teat canal keratin collected before and after milking from Holstein and Jersey cows. *J Dairy Sci*, **74** (2): 414-420.
- Bor, A., Winkler, M. e Gootwine, 1989. Non-clinical intramammary infections in lactating ewes and its association with clinical mastitis. *Br Vet J*, **145**: 178-184.
- Burton, J. e Kehrl, M., 1995. Regulation of neutrophil adhesion molecules and shedding of *Staphylococcus aureus* in milk of cortisol- and dexamethasone-treated cows, *Am J Vet Res*, **56** (8): 997-1006
- Burvenich, C., Paape, M. J., Hill, A. W., Guidry, A. J., Miller, R. H., Heyneman, R., Kremer, W. D. J. e Brand, A., 1994. Role of the



- neutrophil leukocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. *Vet Q*, **16** (1): 45-50.
- Cai, T.-Q., Weston, P. G., Lund, L. A., Brodie, B., McKeena, D. J. e Wagner, W. C., 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res*, **55** (7): 934-943.
- Caparon, M. G., Stephens, D. S., Olsén, A. e Scott, J. R., 1991. Role of M protein in adherence of group A Streptococci. *Infect Immun*, **59** (5): 1811-1817.
- Capuco, A. V., Bright, S. A., Pankey, J. W., Wood, D. L., Miller, R. H. e Bitman, J., 1992. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat keratin. *J Dairy Sci*, **75** (8): 2126-2130.
- Chesworth, J., 1992. Ruminant nutrition. The MacMillan Press Ltd, London, 38.
- Cifrian, E., Guidry, A. J., O'Brien, C. N., Nickerson, S. C. e Marquardt, W. W., 1994. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*, **77** (4): 970-983.
- Cifrian, E., Guidry, A. J., O'Brien, C. N. e Marquardt, W. W., 1996. Effect of antibodies to staphylococcal  $\alpha$  and  $\beta$  toxins and *Staphylococcus aureus* on the cytotoxicity for and adherence of the organism to bovine mammary epithelial cells. *Am J Vet Res*, **57** (9): 1308-1311.
- Colditz, I. G. e Watson, D. L., 1985. The immunophysiological basis for vaccinating ruminants against mastitis. *Aust Vet J*, **62** (5): 145-153.
- Coles, E. H., 1979. Le Laboratoire en clinique vétérinaire. Éditions Vigot, Paris
- Courtney, H. S., Ofek, I., Simpson, W. A., Hasty, D. L. e Beachey, E. H., 1986. Binding of *Streptococcus pyogenes* to soluble and insoluble fibronectin. *Infect Immun*, **53** (3): 454-459.
- Craven, N. e Williams, M. R., 1985. Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Vet Immunol Immunopathol*, **10** (1): 71-127.
- Cree, R., Phillips, I. E Noble, W. C., 1995. Adherence characteristics of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from patients with infective endocarditis. *J Microbiol*, **43**: 161-168
- Daley, M. J., Oldham, E. R., Williams, T. e Coyle, P. A., 1991. Quantitative and qualitative properties of host polymorphonuclear cells during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in cows. *Am J Vet Res*, **52** (3): 474-479.

- Dodd, F. H., 1983. Mastitis - Progress on control. *J Dairy Sci*, **66** (8): 1773-1780.
- Doré, M., Slauson, D. O. e Nielsen, n. R., 1991. Decreased respiratory burst activity in neonatal bovine neutrophils stimulated by protein kinase C agonists. *Am J Vet Res*, **52** (3): 375-380.
- East, N. E. e Birnie, E. F., 1983. Diseases of the udder. *Veterinary Clinics of North America*, **5** (3): 591-600.
- Ferrando, R., 1964. Les bases de l'alimentation. Deuxième edition, Vigot Frères, Editeurs, Paris, 127-130.
- Ferreira-Dias, G., Nequin, L. G. e King, S. S., 1993. Displacement of *Streptococcus zooepidemicus* from equine uterine epithelium by N-acetyl-D-galactosamine *in vitro*. *Journal of Equine Veterinary Science*, **13** (9): 489-494.
- Ferreira-Dias, G., Nequin, L. G. e King, S. S., 1994. Influence of estrous cycle stage on adhesion of *Streptococcus zooepidemicus* to equine endometrium. *Am J Vet Res*, **55** (7): 1028-1031.
- Frost, A. J., 1975, Selective adhesion of microorganisms to the ductal mammary gland, *Infect Immun*, **12**: 1154-1156
- Fthenakis, G. C. e J. E. T. Jones, 1990. The effect of experimentally induced subclinical mastitis on milk yeld and on the growth of lambs. *Br vet J*, **146**: 43-49.
- Fthenakis, G. C., El-Masannat, E. T. S., Booth, J. M., 1991. Somatic cell counts of ewes milk. *Br vet J*, **147**: 575-581.
- Fthenakis, G. C., Marples, R. R., Richardson, J. F. e J. E. T. Jones, 1994. Some properties of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cases of ovine mastitis. *Epidemiol Infect*, **112**: 171-176.
- Gudding, R., McDonald, J. e Cheville, N. F., 1984. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *Am J Vet Res*, **45** (12): 2525-2531.
- Guidry, A. J., Paape, M. J. e Pearson, R. E., 1976. Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow. *Am J Vet Res*, **37**, (10): 1195 - 1200.
- Hoedemaker, M., Lund, L. A. e Wagner, W. C., 1992. Function of neutrophils and chemoattractant properties of fetal placental tissue during the last month of pregnancy in cows. *Am J Vet Res*, **53** (9): 1524-1529.

- Hueston, W. D., Hartwig, N. R. e Judy, J. K., 1986. Detection of ovine intramammary infection with the California mastitis test. *JAVMA*, **188** (5): 522-524.
- Humphreys, D. J., 1990. Toxicología Veterinaria. Tercera edición, McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid, 82-85.
- Hungerford, T. G., 1990. Diseases of livestock. Ninth edition, McGraw-Hill Book Company, Sydney, 1546-1548; 1622-1623.
- Isberg, R., 1991. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science*, **252**, 934 -938.
- Iturralde, M., Aguilar, B., Balsega, R. e Amorena, B., 1993. Adherence of ruminant mastitis *Staphylococcus aureus* strains to epithelial cells from ovine mammary gland primary cultures and from a rat intestinal cell line. *Vet Microbiol*, **38**, 115-127.
- Jain, N. C., 1979. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *J Dairy Sci*, **62** (1): 128-134.
- Jain, N. C., 1993. Essentials of veterinary hematology. Lea & Febiger, Philadelphia: 22.
- Jones, J. E. T., 1991. Mastitis in sheep. Breeding for disease resistance in farm animals, Ed. J. B. Owen, R. F. E., Axford, CAB International, 412-423.
- Keisler, D. H., Andrews, M. L. e Moffatt, R. J., 1992. Subclinical mastitis in ewes and its effect on lamb performance. *J Anim Sci*, **70**: 1677-1681.
- Kellogg, D. W., 1990. Zinc methionine affects performance of lactating cows. *Feedstuffs*, **62** (35):15-17;28.
- Kimura, A., Mountzouros, K. T., Relman, D. A., Falkow, S. e Cowell, J., 1990. *Bordella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect Immun*, **58** (1): 7-16.
- Kraehenbuhl, J. P., 1977. Dispersed mammary gland epithelial cells, I. Isolation and separation procedures. *J Cell Biol*, **72**: 390-405.
- Lee, C. S., Meeusen, E. e Brandon, M. R., 1989. Subpopulations of lymphocytes in the mammary gland of sheep. *Immunology*, **66**: 388-393.
- Lin, Y., Turner, J. D. e Zhao, X., 1995. Morphologic observation of neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium *in vitro*. *Am J Vet Res*, **56** (2): 203-207.

- Lowe, J., 1993 Protected minerals, an expensive luxury or a cost-effective necessity? *Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's Ninth Annual Symposium*, T. P. Lyons, U.S.A., 61-69.
- MacDonald, E. A., Xia, L., Monardes, H. e Turner, J. D., 1994. Neutrophil function *in vitro*: diapedesis and phagocytosis. *J Dairy Sci*, **77** (2): 628-638.
- Mattila, T., 1985. Diagnostic problems in bovine mastitis with special reference to new applications of milk antitripsin, NAGase and bacterial growth. PhD Thesis, Helsinki, Finland.
- McDonald, P., Edwards, R. A. e Greenhalgh, J. F. D., 1988. Animal nutrition. Fourth edition, Longman Scientific & Technical, Harlow, England, 90-116.
- McDowell, L. R., 1992. Minerals in animal and human nutrition. Academic Press, U.S.A., 265-293.
- Miller, W. J., 1970. Zinc nutrition in cattle: a review. *J Dairy Sci*, **53** (8): 1123-1135.
- Miller, R. H., Paape, M. J., Filep, R. e Link, S., 1993. Flow cytometric analysis of neutrophils in cows' milk. *Am J Vet Res*, **54** (12): 1975-1979.
- Myers, M. J., Farrell, D. E. e Henderson, M., 1995. *In vitro* modulation of bovine blood neutrophils and mononuclear cells by oxytetracycline. *Am J Vet Res*, **56** (8): 1007-1011.
- Nickerson, S. C., 1985. Immune mechanisms of the bovine udder: an overview. *JAVMA*, **187** (1): 41-47.
- Nickerson, S. C. e Heald, C. W., 1981. Histopathologic response of the bovine mammary gland to experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. *Am J Vet Res*, **42** (8): 1351-1355.
- Nickerson, S. C., Paape, M. J. e Dulin, A. M., 1985. Effect of antibiotics and vehicles on bovine mammary polymorphonuclear leukocyte morphologic features, viability and phagocytic activity *in vitro*. *Am J Vet Res*, **46** (11): 2259-2265.
- Olmsted, S. e Norcross, N., 1992. Effect of specific antibody on adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Infect Immun*, **60**, (1): 249-256.
- Opdebeeck, J. P., 1982. Mammary gland immunity. *JAVMA*, **181** (10): 1061-1065.

- Opdebeeck, J. P., Frost, J. P. e O'Boyle, D., 1988. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Vet Microbiol*, **16** (1): 77-86.
- Paape, M. J. e Guidry, A. J., 1977. Effect of fat and casein on intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by milk leukocytes. *Proc Soc Exp Biol Med*, **155**: 588-593.
- Paape, M. J. e Pearson, R. E., 1979. Sources of variation in *in vitro* phagocytosis assays. *Am J Vet Res*, **40**, (5): 630-635.
- Paape, M. J., Pearson, R. E. e Schultze, W. D., 1978. Variation among cows in the ability of milk to support phagocytosis and in the ability of polymorphonuclear leukocytes to phagocyte *Staphylococcus aureus*. *Am J Vet Res*, **39**, (12): 1907-1910.
- Paape, M. J., Wergin, W. P., Guidry, A. J. e Pearson, R. E., 1979. Leukocytes - second line of defense against invading mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, **62** (1): 135-153.
- Paape, M. J., Gwazdauskas, F. C., Guidry, A. J. e Weinland, B. T., 1981. Concentrations of corticosteroids, leukocytes, and immunoglobulins in blood and milk after administration of ACTH to lactating dairy cattle: effects on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leukocytes. *Am J Vet Res*, **42** (12): 2081-2087.
- Paape, M. J., Nickerson, S. C. e Ziv, G., 1990. *In vivo* effects of chloramphenicol, tetracycline, and gentamicin on bovine neutrophil function and morphologic features. *Am J Vet Res*, **51** (7): 1055-1061.
- Paape, M. J., Miller, R. H. e Ziv, G., 1991. Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. *Am J Vet Res*, **52** (2): 363-366.
- Perdigon, G., Medici, M., Cecilia, M., Nader de Macias, M. E., Haedo, R., Oliver, G. e Pesce de Ruiz Holgado, A. A., 1986. Significance of the presence of bovine milk  $\beta$ -glucuronidase in mastitis detection. *J Dairy Sci*, **69** (1): 27-31.
- Peris, C., Molina, P., Fernandez, N., Rodriguez, M. e Torres, A., 1991. Variation in somatic cell count, California mastitis test, and electrical conductivity among various fractions of ewe's milk. *J. Dairy Sci*, **74** (5): 1553-1560
- Persson, K., Sandgren, C. H. e Rodriguez-Martinez, H., 1992. Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues, using indium-111-labeled neutrophils and biopsies. *Am J Vet Res*, **53** (12): 2235-2240.

- Peterson, K. M., Baseman, J. B. e Alderete, J. F., 1983. *Treponema palladium* receptor binding proteins interact with fibronectin. *J Exp Med*, **157**: 1958-1970.
- Philpot, W. N. e Nickerson, S. C., 1991. Mastitis: counter attack. Babson Bros. Co., Napeville, U.S.A..
- Politis, I., Hidiroglou, M., Batra, T. R., Gilmore, J. A., Gorewit, R. C. e Scherf, H., 1995. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. *Am J Vet Res*, **56** (2): 179-184.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. e Klein, D. A., 1996. Microbiology, Third Edition, Wm. C. Brown Publishers, U.S.A.
- Queiroga, M. C., Marcelino, P. P., Espadaneira, E. M. e Vilela, C. L., 1997. Rastreio de mamites em ovinos: estudo preliminar. *Veterinária Técnica*, (2): 52-55.
- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. e Carter, G. R., 1994. Clinical veterinary microbiology, Wolfe Publishing, London.
- Radostits, O. M., Blood, D. C. e Gay, C. C., 1994. Veterinary medicine. 8ª edição, Ed. Baillière Tindal, U.S.A.
- Saad, A. M., 1989. Studies of bovine mastitis. Use of flow cytometry and effectors of estrogens on the inflammatory response. PhD Thesis, Upsala, Sweden.
- Sartorelli, P., 1990. (comunicação pessoal).
- Schalm, O. W. e Noorlander, D., 1957. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *JAVMA*, **130** (5): 199-204.
- Smits, E., Cifrian, E., Guidry, A. J., Rainard, P., Burvenich, C. e Paape, M. J., 1996. Cell culture system for studying bovine neutrophil diapedesis. *J Dairy Sci*, **79** (8): 1353-1360.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. e Holt, J. G., 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, William & Wilkins Eds., Baltimore, U.S.A..
- Spain, J., 1993. Tissue integrity: a key defence against mastitis infection: the role of zinc proteinates and a theory for mode of action. *Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's Ninth Annual Symposium*, T. P. Lyons, U.S.A., 53-59.
- Stickle, J. E., 1996. The neutrophil. Function, disorders and testing. *Vet Clin North America*, **26** (5): 1013-1023.
- Sugarman, B., 1983. Zinc and infection. *Rev Infect Dis*, **5** (1): 137-147.

- Suttle, N. F., Jones, D. G., 1989. Recent developments in trace element metabolism and function: trace elements, disease resistance and immune responsiveness in ruminants. *J Nutr*, **119** (7): 1055-1064.
- Swanson, J., 1983. *J Exp Med*, **137**: 571 *apud* Isberg, 1991???
- Switalski, L. M., Rydén, C. Rubin, K., Ljungh, Å, Höök, M. e Wadström, T., 1983. Binding fibronectin to *Staphylococcus* strains. *Infect Immun*, **42** (2): 628-633.
- Targowski, S. P., 1983. Role of immune factors in protection of mammary gland. *J Dairy Sci*, **66** (8): 1781-1789.
- Urisu, A., Cowell, J. L. e Manclarck, C. R., 1986. Filamentous Hemagglutinin has a major role in mediating adherence of *Bordetella pertussis* to human WiDr cells. *Infect Immun*, **52** (3): 695-701.
- Vandergrift, B., 1993. The role of mineral proteinates in Immunity and Reproduction. What do we really know about them? *Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's Ninth Annual Symposium*, T. P. Lyons, U.S.A., 27-33.
- Vilela, C. L., 1993. Interaction of *Pasteurella haemolytica* with the ovine mammary gland. PhD Thesis, Bristol, U.K..
- Wanasighe, D. D., 1981a. *In vitro* adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary gland epithelial cells. *Acta vet Scand*, **22**, 99-108.
- Wanasighe, D. D., 1981b. Adherence as a prerequisite for infection of the bovine mammary gland by bacteria. *Acta vet Scand*, **22**: 109-117.
- Watkins, G. H., Burriel, A. R. e Jones, J. E. T., 1991. A field investigation of subclinical mastitis in sheep in Southern England. *Br vet J*, **147**: 413-420.
- Watson, D. L., Franklin, N. A., Davies, H. I., Kettlewell, P. e Frost, A. J., 1990. Survey of intramammary infections in ewes on the New England tableland of New South Wales, *Aust Vet J.*, **67** (1): 6-8.
- Watson, G. L., Slocombe, R. F., Robinson, N. E. e Sleight, S. D., 1995. Definition of chemiluminescence and superoxide production responses of bovine neutrophils to selected soluble and particulate stimulants, and comparisons with responses to *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res*, **56** (8): 1045-1054.
- Ziv, G., Paape, M. J. e Dulin, A. M., 1983. Influence of antibiotics and intramammary antibiotics products on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes. *Am J Vet Res*, **44** (3): 385-388.

**ANEXO A - Ovelhas incluídas no ensaio.**



## Caracterização dos três grupos de ovelhas

GRUPO 11ZB						
Ident. do animal	Idade (96)	Nº partos até 97	Último parto	Obs.	Ident. do animal	
					Nº	Raça
004	MB	8	21-09-97			
203	SEB	4	03-09-97			
223	MP	4		Excluída		
302	SEP	3	02-09-97			
303	SEB	3	01-01-97			
311	MB	3	17-01-97	Abatida		
329	MB	3	06-01-97	Abatida		
354	L	3	19-01-97			
401	SEB	2	17-01-97			
409	L	2	13-02-97			
432	L	2	23-01-97			
433	L	2	28-01-97			
436	SEP	2	14-08-97			
437	SEP	2	14-01-97			
441	MB	2	13-01-97			
502	L	1	11-01-97			
504	L	1	12-08-97			
506	L	1	12-08-97			
515	SEP	1	18-08-97			
518	SEB	1	18-01-97			
520	SEB	1	31-08-97			
529	SEB	1	15-08-97			
915	MB	7	03-08-97			
9001	ME	7	31-12-96			

GRUPO 22ZM						
Ident. do animal	Idade (96)	Nº partos até 97	Último parto	Obs.	Ident. do animal	
					Nº	Raça
033	MB	6	07-01-97			
309	MB	6	02-01-97	Abatida		
356	L	3	17-01-97			
364	L	3	24-01-97			
402	SEB	2	07-01-97			
403	SEB	2	11-02-97			
404	SEB	2	14-01-97			
414	L	2	17-01-97			
420	L	2	17-01-97			
430	MB	2	18-08-97			
438	SEP	2	13-08-97			
442	SEP	2	17-01-97			
465	MP	2	04-09-97			
473	MB	2	18-01-97			
491	MB	2	02-01-97			
507	L	1	13-08-97			
509	L	1	30-08-97			
509	MB	1	02-09-97			
514	SEP	1	01-09-97			
519	SEB	1	02-09-97			
527	SEB	1	18-08-97			
530	SEB	1	08-10-97			
906	MB	7	22-01-97			
2004	MB	4	17-01-97	Abatida		

GRUPO 33CO						
Ident. do animal	Idade (96)	Nº partos até 97	Último parto	Obs.	Ident. do animal	
					Nº	Raça
213	SEP	4	11-10-96			
303	SEP	3	29-01-97			
304	SEB	3	05-10-96			
328	MB	3	03-08-97			
355	L	3	20-01-97			
421	L	2	09-02-97			
425	L	2	21-01-97			
429	L	2	21-01-97			
431	L	2	15-02-97			
434	MB	2	14-08-97			
441	SEP	2	18-08-97			
501	L	1	16-01-97			
508	L	1	12-08-97			
513	SEP	1	03-02-97			
516	SEP	1	18-08-97			
517	SEP	1	30-01-97			
522	L	1	25-09-97			
523	SEB	1	15-08-97			
526	SEB	1	15-08-97			
941	MB	7	03-01-97			
1158	MB	5	30-01-96	Abatida		
1858	MP	5		Excluída		
1958	MB	5	14-01-97	Abatida		
9007	MA	7	12-09-97			

## **ANEXO B - Rastreios de mamites subclínicas.**

## Resultados dos rastreios e identificação dos agentes etiológicos de mamites subclínicas

GRUPO 11ZB									
Ident. do animal		Resultado do rastreio preliminar		Resultado do 1º TCM		Resultado do 2º TCM		Resultado do 3º TCM	
Nº	Raça	D	E	D	E	D	E	D	E
004	MB	-	-	-	-	-	++	-	-
203	SEB	?	?	-	-	-	-	-	-
223	MP	?	?	-	-	Foi excluída do ensaio			
302	SEP	-	-	-	-	-	-	-	-
303	SEB	S	+	-	-	-	-	-	-
311	MB	-	-	-	-	-	-	-	-
329	MB	-	-	-	-	-	-	-	-
354	L	+++	+	-	-	-	-	-	-
		<i>Staph. xylosum</i>							
401	SEB	-	-	-	-	S	+	-	-
409	L	?	?	-	-	-	-	-	-
432	L	-	+++	-	+++	-	-	-	-
		<i>Staph. xylosum</i>							
433	L	+++	-	-	-	+++	-	-	-
		<i>Staph. hyicus</i>							
436	SEP	-	-	-	-	-	-	-	-
437	SEP	-	-	-	-	-	-	-	-
441	MB	-	-	-	-	-	-	-	-
502	L	-	-	-	-	-	-	-	-
504	L	-	-	-	-	-	-	-	++
								<i>S. epidermidis</i>	
506	L	+	+	-	-	-	+++	-	-
515	SEP	-	-	-	-	-	-	-	-
518	SEB	-	S	-	-	-	+	-	-
520	SEB	-	-	+	+	-	-	-	-
529	SEB	?	?	-	-	-	-	-	-
915	MB	-	-	-	-	-	+++	-	-
9001	ME	-	-	-	-	-	-	-	-

## Resultados dos rastreios e identificação dos agentes etiológicos de mamites subclínicas

GRUPO 22ZM									
Ident. do animal		Resultado do rastreio preliminar		Resultado do 1º TCM		Resultado do 2º TCM		Resultado do 3º TCM	
Nº	Raça	D	E	D	E	D	E	D	E
033	MB	-	-	-	-	-	-	-	-
309	SEB	-	-	-	-	++	++	+	+
								Negativo	Negativo
356	L	-	++	-	-	-	-	-	-
364	L	++	+	++	+++	-	-	-	-
402	SEB	-	-	-	-	-	-	-	-
403	SEB	?	?	+	-	-	-	-	-
404	SEB	-	-	-	-	S	-	-	-
414	L	-	-	-	-	S	-	-	-
420	L	S	S	++	+++	+++	+	S	S
								<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
430	MB	?	?	-	-	++	-	-	-
438	SEP	-	-	-	-	++	++	-	-
442	SEP	-	-	-	-	-	-	-	-
465	MP	-	-	-	-	-	-	-	S
									Negativo
473	MB	-	-	-	-	-	-	-	-
491	MB	-	-	-	-	+++	+++	-	-
507	L	+	+	-	-	-	-	-	-
509	L	-	-	-	-	-	-	-	-
509	MB	?	?	S	-	-	+	-	-
514	SEP	+	-	-	-	-	-	-	+
									<i>S. xylosum</i>
									<i>Micrococcus sp.</i>
519	SEB	-	S	-	-	-	-	-	-
527	SEB	+++	++	-	-	-	-	-	-
		<i>S. capitis</i>	Negativo						
		<i>Micrococcus sp.</i>							
530	SEB	-	-	-	-	+	+	-	-
906	MB	-	-	-	-	+	+++	-	-
2004	MB	-	-	-	-	-	-	-	-

## Resultados dos rastreios e identificação dos agentes etiológicos de mamites subclínicas

GRUPO 33CO									
Ident. do animal		Resultado do rastreio preliminar		Resultado do 1º TCM		Resultado do 2º TCM		Resultado do 3º TCM	
Nº	Raça	D	E	D	E	D	E	D	E
213	SEP	-	S	-	-	+	-	-	-
			Negativo						
303	SEP	-	-	-	-	-	-	-	-
304	SEB	-	-	-	-	-	-	-	-
328	MB	-	-	-	-	-	-	-	-
355	L	-	-	-	-	-	-	-	-
421	L	?	?	-	-	-	-	-	-
425	L	-	++	++	-	-	-	-	-
429	L	-	-	S	-	-	-	-	-
431	L	?	?	-	-	-	-	-	-
434	MB	-	-	-	-	-	+++	-	-
441	SEP	++	++	-	-	-	S	-	-
501	L	-	+	-	-	-	-	-	-
508	L	-	-	-	-	-	-	-	-
513	SEP	-	-	-	-	-	-	-	-
516	SEP	-	-	-	-	-	-	-	-
517	SEP	?	?	-	-	S	-	-	-
522	L	?	?	-	-	-	-	-	-
523	SEB	S	-	-	-	-	-	-	S
									Negativo
526	SEB	-	-	-	-	-	-	-	-
941	MB	-	-	-	-	-	-	-	-
1158	MB	?	?	-	-	-	-	-	-
1858	MP	-	-	-	-	Foi excluída do ensaio			
1958	MB	++	+++	+	++	-	-	-	-
		Sem colheita	Staph. aureus						
9007	MA	-	-	-	-	-	-	S	-
								Coryne. sp.	

**ANEXO C - Testes de sensibilidade a antibióticos.**







Resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos das espécies bacterianas isoladas no rastreio preliminar e no último rastreio do ensaio

MICROORG.	ANTIBIÓTICOS																																									
	AMP			B			CL			CFP			CKM			OB			CT			S			CN			MY														
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S						
<i>Corynebacterium</i> sp.	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0			
n=1	100%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%				
<i>Micrococcus</i> sp.	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	2	1	0	1	0	1	0	1	0	0	2	1	0	0	2	1	0	0	0	2	1	0	1	0	2	1	0	1	0			
n=2	50%	0%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	100%	50%	0%	50%	0%	50%	0%	50%	0%	0%	100%	50%	0%	50%	0%	50%	0%	0%	100%	50%	0%	100%	50%	0%	100%	50%	0%	50%				
<i>Staph. aureus</i>	2	0	3	2	0	3	2	0	3	0	5	2	0	3	2	0	3	1	0	4	1	0	4	1	0	4	0	0	4	0	0	5	2	1	2	1	2	1				
n=5	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	0%	100%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	20%	0%	80%	20%	0%	80%	20%	0%	80%	0%	0%	100%	40%	0%	100%	40%	20%	20%	40%						
<i>Staph. capitis</i>	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	1	0			
n=2	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	50%	0%	50%					
<i>Staph. chromogenes</i>	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	1	3			
n=4	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	25%	75%						
<i>Staph. epidermidis</i>	4	0	7	2	0	9	2	0	9	0	11	2	0	9	3	0	8	3	2	6	4	2	5	0	0	5	0	0	11	2	3	3	6	8	6	8						
n=11	36%	0%	64%	18%	0%	82%	19%	0%	82%	0%	100%	18%	0%	82%	27%	0%	73%	27%	18%	55%	36%	18%	45%	0%	0%	45%	0%	0%	100%	21%	18%	18%	65%									
<i>Staph. hyicus</i>	8	0	6	0	0	14	0	0	14	0	5	9	0	14	0	0	14	0	6	0	6	0	6	0	0	6	0	0	14	3	8	3	8	3	8							
n=14	67%	0%	43%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	36%	64%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	67%	0%	67%	0%	67%	0%	0%	67%	0%	0%	100%	21%	57%	57%	97%									
<i>Staph. simulans</i>	2	0	4	0	0	6	0	0	6	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	4	0						
n=6	33%	0%	67%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	67%	0%	33%								
<i>Staph. xylosum</i>	5	0	20	1	1	23	1	0	24	0	25	1	0	24	1	0	24	1	2	22	1	2	22	1	2	22	0	0	25	20	1	4	4									
n=25	20%	0%	80%	4%	4%	92%	4%	0%	96%	0%	100%	4%	0%	96%	4%	0%	96%	4%	6%	88%	4%	6%	88%	4%	6%	88%	0%	0%	100%	80%	4%	16%	18%									
TOTALS	23	0	47	6	1	63	7	0	63	1	5	64	7	0	63	7	0	63	7	4	50	7	4	50	7	4	50	1	0	68	34	14	22									
n=70	33%	0%	67%	9%	1%	90%	10%	0%	90%	1%	7%	91%	10%	0%	90%	1%	90%	10%	1%	86%	23%	6%	71%	10%	6%	84%	1%	0%	99%	49%	20%	31%										

Resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos das espécies bacterianas isoladas no rastreio preliminar e no último rastreio do ensaio

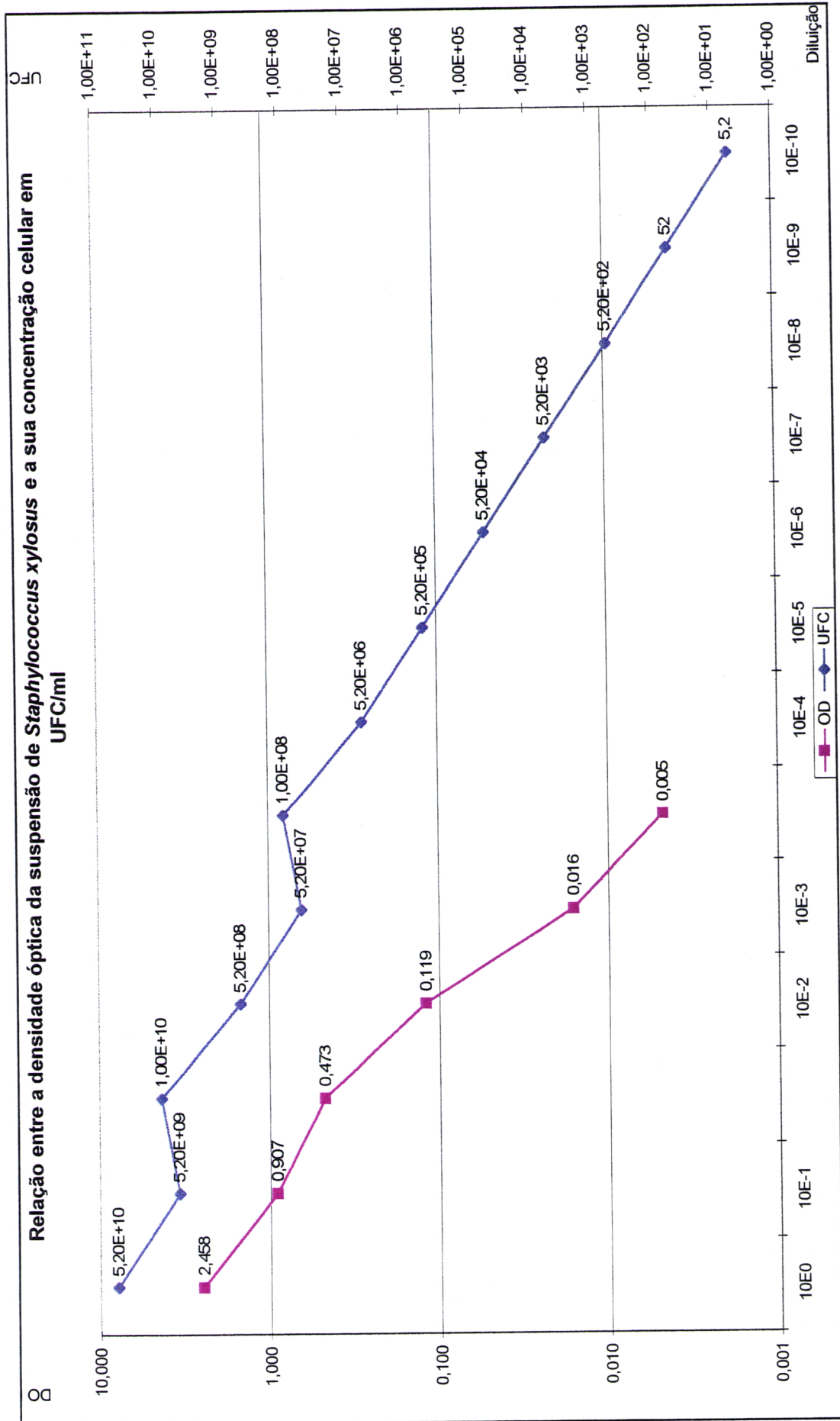
MICROORG.	ANTIBIÓTICOS																																																					
	N						NV						OL						OX						P						PB						RD						SE						W					
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S						
<i>Corynebacterium sp.</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
n=1	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%						
<i>Micrococcus sp.</i>	0	0	2	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1						
n=2	0%	0%	100%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	50%												
<i>Staph. aureus</i>	0	1	4	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3						
n=5	0%	20%	80%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	40%	0%	60%												
<i>Staph. capitis</i>	0	0	2	1	0	1	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2						
n=2	0%	0%	100%	50%	0%	50%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%												
<i>Staph. chromogenes</i>	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4						
n=4	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%												
<i>Staph. epidermidis</i>	0	0	11	2	0	9	2	1	8	4	0	7	3	1	7	0	0	11	2	1	8	4	0	7	3	1	7	0	0	11	2	1	8	4	0	7	3	1	7	0	0	11												
n=11	0%	0%	100%	18%	0%	82%	18%	9%	73%	36%	0%	64%	27%	9%	64%	0%	0%	100%	18%	9%	73%	36%	0%	64%	27%	9%	64%	0%	0%	100%	18%	9%	73%	36%	0%	64%																		
<i>Staph. hyicus</i>	0	0	14	2	1	11	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14	0	0	14												
n=14	0%	0%	100%	14%	7%	79%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%																		
<i>Staph. simulans</i>	0	0	6	1	0	5	0	0	6	1	0	5	1	0	5	0	0	6	0	0	6	1	0	5	1	0	5	0	0	6	0	0	6	1	0	5	1	0	5	0	0	6												
n=6	0%	0%	100%	17%	0%	83%	0%	0%	100%	17%	0%	83%	17%	0%	83%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	17%	0%	83%	17%	0%	83%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	17%	0%	83%																		
<i>Staph. xylosum</i>	0	0	25	19	3	3	1	0	24	8	0	17	6	0	19	0	0	25	1	0	24	8	0	17	6	0	19	0	0	25	1	0	24	8	0	17																		
n=25	0%	0%	100%	76%	12%	12%	4%	0%	96%	32%	0%	68%	24%	0%	76%	0%	0%	100%	4%	0%	96%	32%	0%	68%	24%	0%	76%	0%	0%	100%	4%	0%	96%	32%	0%	68%																		
<b>TOTAIS</b>	0	1	69	29	4	37	7	1	62	17	0	63	25	1	44	1	1	68	8	1	61	19	0	51	11	0	51	1	0	59	0%	1%	99%	41%	6%	83%																		
n=70	0%	1%	99%	41%	6%	83%	10%	1%	89%	24%	0%	76%	36%	1%	63%	1%	1%	97%	11%	1%	87%	27%	0%	73%	16%	0%	84%	0%	0%	96%	0%	0%	100%	16%	0%	96%																		

Resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos dos géneros bacterianos isolados no rastreio preliminar e no último rastreio do ensalo

MICROORG.	ANTIBIÓTICOS																					
	AMP		B		CL		CFP		CXM		OB		CT		S		CN		MY			
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	
<i>Corynebacterium sp.</i> n=1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
	100%	0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%
<i>Micrococcus sp.</i> n=2	1	0	1	1	0	1	0	2	1	0	1	0	1	0	2	1	0	1	0	2	1	0
	50%	0%	50%	50%	0%	50%	0%	100%	50%	0%	50%	50%	0%	100%	50%	0%	50%	0%	100%	50%	0%	50%
<i>Staphylococcus sp.</i> n=67	21	0	46	5	1	61	5	0	62	5	0	62	0	5	62	5	0	61	16	4	47	6
	31%	0%	69%	7%	1%	91%	7%	0%	93%	7%	0%	93%	0%	7%	93%	7%	0%	91%	24%	6%	70%	9%
TOTALS n=70	23	0	47	6	1	63	7	0	63	7	0	63	1	6	64	7	0	63	7	4	60	7
	33%	0%	67%	9%	1%	90%	10%	0%	90%	10%	0%	90%	1%	7%	91%	10%	0%	89%	10%	6%	71%	10%

MICROORG.	ANTIBIÓTICOS																					
	N		NV		OL		OX		P		PB		RD		SE		W					
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S				
<i>Corynebacterium sp.</i> n=1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
	0%	0%	100%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	0%
<i>Micrococcus sp.</i> n=2	0	0	2	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	1	0	1	0	1	0	2	0
	0%	0%	100%	50%	0%	50%	0%	50%	0%	50%	0%	50%	0%	100%	50%	0%	50%	0%	50%	100%	0%	0%
<i>Staphylococcus sp.</i> n=67	0	1	66	27	4	36	5	1	61	15	0	52	23	1	43	0	1	66	6	1	60	18
	0%	1%	95%	40%	6%	84%	7%	1%	91%	22%	0%	78%	34%	1%	64%	0%	1%	99%	9%	1%	90%	27%
TOTALS n=70	0	1	69	29	4	37	7	1	62	17	0	53	25	1	44	1	1	68	8	1	61	19
	0%	1%	99%	41%	6%	85%	10%	1%	89%	24%	0%	76%	36%	1%	63%	1%	1%	97%	11%	1%	87%	27%

**ANEXO D - Relação entre a densidade óptica e a concentração em UFC/ml de uma suspensão de bacteriana.**



**ANEXO E - Resultados do ensaio de adesão bacteriana.**

Resultados do ensaio de adesão a células epiteliais em suspensão

Nº do animal		Grupo
311MB		11
Células	Bactérias aderentes	
1	2	
2	2	
3	1	
4	3	
5	6	
6	1	
7	1	
8	0	
9	3	
10	3	
11	0	
12	6	
13	0	
14	1	
15	2	
16	1	
17	1	
18	2	
19	4	
20	6	
21	2	
22	3	
23	0	
24	0	
25	13	
26	3	
27	2	
28	9	
29	0	
30	2	
31	2	
32	0	
33	0	
34	2	
35	3	
36	2	
37	5	
38	7	
39	3	
40	4	
41	3	
42	8	
43	0	
44	3	
45	4	
46	0	
47	2	
48	2	
49	0	
50	1	
51	0	
52	3	
53	3	
54	2	
55	0	
56	1	
57	1	
58	0	
59	1	
60	0	
61	0	
62	4	
63	0	
64	3	
65	0	
66	1	
67	3	
68	0	
69	1	
70	3	
71	2	
72	5	
73	4	
74	0	
75	0	
76	1	
77	0	
78	0	
79	1	
80	4	
81	2	
82	0	
83	2	
84	3	
85	2	
86	0	
87	0	
88	3	
89	2	
90	4	
91	2	
92	0	
93	1	
94	2	
95	4	
96	2	
97	1	
98	0	
99	3	
100	1	

Nº do animal		Grupo
329MB		11
Células	Bactérias aderentes	
1	9	
2	2	
3	0	
4	1	
5	2	
6	0	
7	0	
8	2	
9	6	
10	1	
11	0	
12	13	
13	2	
14	0	
15	3	
16	2	
17	1	
18	2	
19	1	
20	0	
21	5	
22	2	
23	3	
24	4	
25	0	
26	2	
27	1	
28	0	
29	1	
30	0	
31	2	
32	3	
33	0	
34	0	
35	2	
36	0	
37	0	
38	4	
39	2	
40	4	
41	0	
42	1	
43	3	
44	0	
45	3	
46	0	
47	0	
48	0	
49	1	
50	3	
51	1	
52	3	
53	4	
54	0	
55	2	
56	9	
57	1	
58	1	
59	2	
60	1	
61	1	
62	0	
63	0	
64	0	
65	3	
66	1	
67	3	
68	3	
69	2	
70	0	
71	2	
72	3	
73	0	
74	4	
75	4	
76	3	
77	3	
78	0	
79	0	
80	2	
81	4	
82	3	
83	3	
84	3	
85	6	
86	2	
87	3	
88	0	
89	1	
90	4	
91	8	
92	0	
93	0	
94	8	
95	2	
96	5	
97	0	
98	3	
99	1	
100	4	

Resultados do ensaio de adesão a células epiteliais em suspensão

Nº do animal		Grupo
309MB		22
Células	Bactérias aderentes	
1	3	
2	0	
3	6	
4	5	
5	1	
6	14	
7	2	
8	3	
9	4	
10	7	
11	1	
12	3	
13	2	
14	2	
15	2	
16	1	
17	6	
18	5	
19	2	
20	0	
21	5	
22	1	
23	2	
24	3	
25	0	
26	3	
27	2	
28	1	
29	0	
30	2	
31	1	
32	3	
33	4	
34	3	
35	0	
36	1	
37	1	
38	2	
39	3	
40	0	
41	0	
42	2	
43	3	
44	4	
45	0	
46	2	
47	0	
48	9	
49	0	
50	7	
51	4	
52	3	
53	1	
54	4	
55	4	
56	0	
57	2	
58	0	
59	2	
60	2	
61	1	
62	8	
63	2	
64	1	
65	4	
66	0	
67	0	
68	2	
69	0	
70	0	
71	2	
72	1	
73	2	
74	4	
75	7	
76	2	
77	1	
78	14	
79	6	
80	0	
81	6	
82	5	
83	0	
84	8	
85	4	
86	2	
87	6	
88	2	
89	3	
90	2	
91	3	
92	5	
93	0	
94	2	
95	1	
96	4	
97	3	
98	4	
99	2	
100	0	

Nº do animal		Grupo
2004MB		22
Células	Bactérias aderentes	
1	2	
2	0	
3	5	
4	0	
5	4	
6	0	
7	2	
8	1	
9	1	
10	3	
11	4	
12	6	
13	6	
14	1	
15	0	
16	0	
17	4	
18	2	
19	13	
20	12	
21	3	
22	8	
23	1	
24	19	
25	3	
26	6	
27	1	
28	3	
29	4	
30	0	
31	6	
32	2	
33	4	
34	3	
35	0	
36	9	
37	1	
38	10	
39	7	
40	14	
41	4	
42	4	
43	3	
44	2	
45	6	
46	3	
47	2	
48	6	
49	3	
50	4	
51	2	
52	5	
53	3	
54	10	
55	0	
56	1	
57	3	
58	0	
59	5	
60	0	
61	5	
62	0	
63	3	
64	0	
65	3	
66	1	
67	0	
68	4	
69	0	
70	1	
71	1	
72	3	
73	4	
74	1	
75	6	
76	0	
77	2	
78	0	
79	1	
80	3	
81	4	
82	0	
83	2	
84	3	
85	0	
86	5	
87	1	
88	0	
89	2	
90	0	
91	3	
92	7	
93	3	
94	2	
95	5	
96	3	
97	1	
98	6	
99	2	
100	2	



Resultados do ensaio de adesão a células epiteliais em suspensão

Nº do animal	Grupo
1158MB	33
Células	Bactérias aderentes
1	2
2	7
3	4
4	3
5	4
6	2
7	4
8	2
9	4
10	2
11	1
12	5
13	2
14	2
15	2
16	1
17	0
18	2
19	11
20	0
21	6
22	9
23	0
24	4
25	4
26	12
27	1
28	0
29	7
30	1
31	2
32	3
33	0
34	4
35	6
36	3
37	2
38	0
39	5
40	3
41	3
42	2
43	2
44	2
45	10
46	6
47	2
48	3
49	13
50	2
51	2
52	3
53	4
54	0
55	3
56	4
57	2
58	5
59	3
60	3
61	4
62	5
63	6
64	0
65	1
66	4
67	5
68	2
69	0
70	2
71	2
72	4
73	2
74	0
75	8
76	2
77	1
78	5
79	4
80	0
81	1
82	5
83	5
84	3
85	1
86	2
87	0
88	3
89	2
90	7
91	3
92	8
93	3
94	7
95	7
96	1
97	5
98	5
99	2
100	3

Nº do animal	Grupo
1958MB	33
Células	Bactérias aderentes
1	10
2	4
3	3
4	2
5	7
6	4
7	6
8	1
9	4
10	6
11	4
12	8
13	6
14	8
15	1
16	2
17	4
18	1
19	9
20	4
21	4
22	5
23	3
24	4
25	5
26	5
27	6
28	9
29	7
30	0
31	3
32	2
33	2
34	3
35	2
36	1
37	2
38	0
39	7
40	4
41	2
42	6
43	6
44	2
45	3
46	2
47	1
48	0
49	3
50	4
51	0
52	1
53	0
54	2
55	4
56	3
57	3
58	3
59	6
60	0
61	1
62	2
63	8
64	2
65	2
66	4
67	5
68	3
69	6
70	5
71	5
72	2
73	3
74	0
75	4
76	3
77	1
78	3
79	0
80	1
81	12
82	3
83	5
84	4
85	0
86	5
87	0
88	6
89	4
90	1
91	1
92	0
93	1
94	3
95	0
96	3
97	3
98	2
99	2
100	4

Resultados do ensaio de adesão a células epiteliais previamente fixadas

Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo
311MB		11	311MB		11	320MB		11	320MB		11
Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes	
1	0		101	0		101	0		1	0	
2	0		102	0		102	0		2	0	
3	0		103	0		103	0		3	0	
4	0		104	0		104	0		4	0	
5	0		105	1		105	0		5	0	
6	0		106	1		106	2		6	0	
7	0		107	0		107	1		7	0	
8	0		108	0		108	0		8	0	
9	0		109	0		109	0		9	0	
10	0		110	0		110	0		10	0	
11	0		111	0		111	0		11	0	
12	0		112	0		112	0		12	0	
13	0		113	0		113	0		13	0	
14	0		114	0		114	0		14	0	
15	0		115	0		115	0		15	0	
16	0		116	0		116	0		16	0	
17	1		117	0		117	0		17	1	
18	4		118	2		118	0		18	0	
19	1		119	0		119	0		19	1	
20	0		120	0		120	0		20	0	
21	0		121	0		121	1		21	1	
22	0		122	0		122	0		22	0	
23	0		123	0		123	0		23	0	
24	0		124	0		124	0		24	0	
25	0		125	0		125	1		25	0	
26	0		126	0		126	0		26	0	
27	0		127	0		127	0		27	0	
28	0		128	0		128	0		28	0	
29	0		129	1		129	0		29	0	
30	0		130	0		130	0		30	0	
31	0		131	0		131	0		31	0	
32	0		132	0		132	0		32	1	
33	0		133	0		133	0		33	0	
34	0		134	0		134	0		34	0	
35	0		135	0		135	0		35	0	
36	0		136	0		136	0		36	0	
37	0		137	0		137	0		37	0	
38	0		138	0		138	0		38	0	
39	0		139	2		139	0		39	0	
40	0		140	2		140	2		40	0	
41	0		141	0		141	0		41	0	
42	0		142	0		142	0		42	0	
43	0		143	0		143	0		43	0	
44	0		144	0		144	0		44	0	
45	0		145	0		145	0		45	0	
46	0		146	0		146	0		46	0	
47	0		147	0		147	0		47	0	
48	0		148	0		148	0		48	0	
49	0		149	0		149	0		49	1	
50	0		150	0		150	0		50	1	
51	0		151	0		151	0		51	0	
52	0		152	0		152	0		52	0	
53	0		153	0		153	0		53	0	
54	0		154	0		154	1		54	0	
55	0		155	0		155	0		55	0	
56	0		156	0		156	0		56	0	
57	0		157	0		157	0		57	0	
58	0		158	0		158	0		58	0	
59	0		159	0		159	0		59	0	
60	1		160	0		160	0		60	2	
61	0		161	0		161	0		61	0	
62	2		162	0		162	0		62	0	
63	0		163	0		163	0		63	1	
64	0		164	0		164	0		64	0	
65	0		165	0		165	0		65	0	
66	0		166	0		166	0		66	0	
67	0		167	0		167	0		67	0	
68	0		168	0		168	0		68	0	
69	0		169	0		169	0		69	0	
70	0		170	0		170	0		70	0	
71	0		171	0		171	0		71	0	
72	0		172	0		172	0		72	0	
73	0		173	0		173	0		73	1	
74	0		174	0		174	0		74	0	
75	0		175	0		175	0		75	0	
76	0		176	0		176	0		76	0	
77	0		177	0		177	0		77	0	
78	0		178	0		178	0		78	0	
79	0		179	0		179	0		79	0	
80	2		180	0		180	0		80	0	
81	0		181	0		181	0		81	0	
82	0		182	0		182	2		82	0	
83	0		183	0		183	0		83	0	
84	0		184	0		184	0		84	0	
85	0		185	0		185	0		85	0	
86	0		186	0		186	0		86	0	
87	0		187	0		187	0		87	2	
88	0		188	0		188	0		88	0	
89	0		189	0		189	0		89	0	
90	0		190	0		190	0		90	0	
91	0		191	0		191	0		91	0	
92	0		192	0		192	0		92	0	
93	0		193	0		193	1		93	0	
94	0		194	0		194	0		94	0	
95	0		195	0		195	0		95	0	
96	0		196	0		196	0		96	0	
97	0		197	0		197	0		97	0	
98	0		198	0		198	0		98	0	
99	0		199	0		199	0		99	0	
100	0		200	0		200	0		100	0	

Resultados do ensaio de adesão a células epiteliais previamente fixadas

Nº do animal 300MB		Grupo 22	Nº do animal 300MB		Grupo 22	Nº do animal 2004MB		Grupo 22	Nº do animal 2004MB		Grupo 22
Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes	
1	0		101	1		101	0		1	0	
2	0		102	0		102	0		2	0	
3	0		103	0		103	0		3	0	
4	0		104	0		104	0		4	0	
5	0		105	0		105	0		5	0	
6	0		106	0		106	0		6	1	
7	0		107	0		107	0		7	1	
8	0		108	0		108	0		8	0	
9	0		109	0		109	0		9	0	
10	0		110	0		110	1		10	0	
11	4		111	0		111	0		11	0	
12	2		112	1		112	0		12	2	
13	2		113	0		113	0		13	0	
14	0		114	0		114	0		14	0	
15	0		115	0		115	0		15	0	
16	0		116	0		116	0		16	0	
17	1		117	0		117	0		17	1	
18	0		118	1		118	0		18	0	
19	3		119	0		119	0		19	0	
20	0		120	0		120	0		20	0	
21	0		121	0		121	1		21	0	
22	0		122	0		122	0		22	0	
23	0		123	1		123	0		23	1	
24	0		124	0		124	0		24	0	
25	1		125	0		125	0		25	0	
26	0		126	0		126	0		26	0	
27	0		127	0		127	1		27	0	
28	1		128	0		128	0		28	0	
29	0		129	0		129	0		29	0	
30	0		130	1		130	0		30	0	
31	1		131	0		131	0		31	0	
32	0		132	0		132	0		32	0	
33	0		133	0		133	0		33	0	
34	2		134	1		134	2		34	0	
35	0		135	0		135	0		35	0	
36	0		136	0		136	0		36	0	
37	0		137	0		137	0		37	0	
38	1		138	0		138	0		38	0	
39	0		139	0		139	0		39	0	
40	0		140	0		140	0		40	0	
41	0		141	0		141	0		41	1	
42	0		142	0		142	0		42	0	
43	2		143	0		143	0		43	0	
44	2		144	0		144	0		44	2	
45	0		145	0		145	0		45	0	
46	0		146	0		146	0		46	0	
47	0		147	0		147	0		47	0	
48	2		148	0		148	0		48	0	
49	0		149	0		149	0		49	0	
50	0		150	0		150	0		50	0	
51	0		151	0		151	0		51	0	
52	3		152	0		152	0		52	0	
53	0		153	2		153	0		53	0	
54	0		154	1		154	0		54	0	
55	1		155	1		155	0		55	1	
56	0		156	1		156	1		56	1	
57	0		157	0		157	0		57	1	
58	0		158	0		158	0		58	1	
59	0		159	0		159	0		59	0	
60	3		160	0		160	0		60	0	
61	0		161	0		161	0		61	0	
62	1		162	0		162	0		62	0	
63	0		163	0		163	0		63	0	
64	0		164	1		164	0		64	1	
65	0		165	0		165	0		65	0	
66	0		166	1		166	0		66	0	
67	1		167	1		167	0		67	1	
68	0		168	0		168	0		68	0	
69	4		169	0		169	0		69	0	
70	0		170	0		170	0		70	0	
71	0		171	0		171	0		71	0	
72	0		172	0		172	0		72	2	
73	0		173	0		173	0		73	0	
74	0		174	0		174	0		74	0	
75	0		175	0		175	0		75	0	
76	0		176	0		176	0		76	0	
77	0		177	1		177	0		77	0	
78	1		178	0		178	0		78	0	
79	0		179	0		179	0		79	0	
80	0		180	0		180	1		80	0	
81	0		181	0		181	0		81	1	
82	2		182	1		182	0		82	0	
83	0		183	0		183	0		83	0	
84	0		184	0		184	0		84	0	
85	2		185	0		185	0		85	0	
86	0		186	1		186	0		86	0	
87	0		187	0		187	3		87	0	
88	0		188	0		188	0		88	0	
89	0		189	0		189	0		89	0	
90	1		190	0		190	0		90	1	
91	0		191	0		191	0		91	0	
92	1		192	2		192	0		92	1	
93	0		193	0		193	0		93	0	
94	0		194	1		194	0		94	0	
95	0		195	0		195	0		95	0	
96	0		196	0		196	0		96	1	
97	0		197	0		197	0		97	0	
98	2		198	0		198	0		98	0	
99	0		199	0		199	0		99	0	
100	0		200	0		200	0		100	0	

Resultados do ensaio de adesão a células epiteliais previamente fixadas

Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo
1158MB		33	1158MB		33	1958MB		33	1958MB		33
Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes	
1	2		101	1		101	1		1	2	
2	0		102	0		102	0		2	0	
3	0		103	0		103	0		3	0	
4	0		104	0		104	0		4	0	
5	0		105	2		105	0		5	0	
6	0		106	0		106	0		6	0	
7	2		107	0		107	0		7	2	
8	0		108	0		108	0		8	0	
9	0		109	0		109	0		9	0	
10	0		110	0		110	0		10	0	
11	1		111	0		111	0		11	4	
12	0		112	0		112	0		12	1	
13	0		113	0		113	2		13	0	
14	0		114	0		114	0		14	0	
15	0		115	0		115	0		15	0	
16	5		116	2		116	0		16	0	
17	0		117	5		117	0		17	0	
18	2		118	0		118	0		18	0	
19	0		119	0		119	0		19	0	
20	0		120	0		120	0		20	0	
21	0		121	0		121	1		21	0	
22	0		122	0		122	2		22	0	
23	0		123	0		123	0		23	0	
24	1		124	1		124	0		24	1	
25	2		125	0		125	0		25	2	
26	2		126	0		126	0		26	0	
27	1		127	2		127	0		27	0	
28	0		128	1		128	0		28	0	
29	0		129	0		129	0		29	0	
30	0		130	0		130	1		30	0	
31	0		131	0		131	0		31	0	
32	0		132	0		132	0		32	0	
33	0		133	0		133	0		33	1	
34	2		134	0		134	0		34	0	
35	4		135	0		135	0		35	0	
36	0		136	0		136	0		36	0	
37	0		137	1		137	0		37	0	
38	0		138	1		138	0		38	0	
39	0		139	0		139	0		39	0	
40	0		140	0		140	0		40	2	
41	2		141	0		141	2		41	1	
42	0		142	0		142	0		42	0	
43	0		143	2		143	0		43	0	
44	0		144	2		144	0		44	1	
45	0		145	0		145	0		45	0	
46	0		146	0		146	0		46	0	
47	2		147	0		147	0		47	0	
48	0		148	0		148	0		48	0	
49	0		149	0		149	2		49	0	
50	2		150	0		150	0		50	0	
51	0		151	0		151	2		51	0	
52	4		152	0		152	0		52	0	
53	0		153	0		153	0		53	2	
54	0		154	0		154	1		54	0	
55	0		155	2		155	0		55	0	
56	0		156	0		156	0		56	0	
57	0		157	0		157	0		57	0	
58	0		158	0		158	0		58	0	
59	0		159	0		159	0		59	0	
60	0		160	2		160	0		60	0	
61	0		161	2		161	0		61	0	
62	0		162	0		162	0		62	0	
63	2		163	0		163	0		63	1	
64	0		164	0		164	0		64	0	
65	0		165	1		165	0		65	0	
66	2		166	1		166	0		66	0	
67	0		167	0		167	2		67	0	
68	0		168	0		168	1		68	0	
69	0		169	0		169	0		69	0	
70	0		170	0		170	0		70	6	
71	0		171	0		171	0		71	0	
72	0		172	1		172	0		72	0	
73	3		173	0		173	0		73	0	
74	4		174	0		174	0		74	0	
75	0		175	0		175	0		75	0	
76	0		176	0		176	3		76	0	
77	1		177	2		177	0		77	0	
78	0		178	0		178	0		78	0	
79	2		179	2		179	0		79	1	
80	2		180	2		180	0		80	2	
81	2		181	1		181	0		81	0	
82	0		182	0		182	0		82	0	
83	0		183	0		183	0		83	0	
84	0		184	0		184	0		84	0	
85	2		185	0		185	1		85	0	
86	0		186	0		186	2		86	0	
87	0		187	0		187	0		87	0	
88	2		188	0		188	1		88	2	
89	0		189	3		189	1		89	0	
90	0		190	0		190	2		90	0	
91	1		191	1		191	0		91	3	
92	0		192	0		192	0		92	0	
93	0		193	0		193	0		93	0	
94	0		194	0		194	0		94	1	
95	0		195	0		195	0		95	0	
96	0		196	0		196	0		96	0	
97	0		197	2		197	0		97	3	
98	4		198	0		198	0		98	0	
99	0		199	0		199	0		99	0	
100	8		200	0		200	0		100	0	

Resultados do ensaio de adoção a tecido epitelial da cisterna de glândula mamária

Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo
311MB		11	311MB		11	311MB		11	311MB		11	311MB		11
Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes	
1	0	0	101	0	0	201	0	0	301	0	0	401	0	0
2	0	0	102	0	0	202	0	0	302	0	0	402	0	0
3	0	0	103	0	0	203	0	0	303	0	0	403	0	0
4	0	0	104	0	0	204	0	0	304	0	0	404	0	0
5	0	0	105	0	0	205	0	0	305	0	0	405	0	0
6	0	0	106	0	0	206	0	0	306	0	0	406	0	0
7	0	0	107	0	0	207	0	0	307	0	0	407	0	0
8	0	0	108	0	0	208	0	0	308	0	0	408	0	0
9	0	0	109	0	0	209	0	0	309	0	0	409	0	0
10	0	0	110	0	0	210	0	0	310	0	0	410	0	0
11	0	0	111	0	0	211	0	0	311	0	0	411	0	0
12	0	0	112	0	0	212	0	0	312	0	0	412	0	0
13	0	0	113	0	0	213	0	0	313	0	0	413	0	0
14	0	0	114	0	0	214	0	0	314	0	0	414	0	0
15	0	0	115	0	0	215	0	0	315	0	0	415	0	0
16	0	0	116	0	0	216	0	0	316	0	0	416	0	0
17	0	0	117	0	0	217	0	0	317	0	0	417	0	0
18	0	0	118	0	0	218	0	0	318	0	0	418	0	0
19	0	0	119	0	0	219	0	0	319	0	0	419	0	0
20	0	0	120	0	0	220	0	0	320	0	0	420	0	0
21	0	0	121	0	0	221	0	0	321	0	0	421	0	0
22	0	0	122	0	0	222	0	0	322	0	0	422	0	0
23	0	0	123	0	0	223	0	0	323	0	0	423	0	0
24	0	0	124	0	0	224	0	0	324	0	0	424	3	0
25	0	0	125	0	0	225	0	0	325	0	0	425	0	0
26	0	0	126	0	0	226	0	0	326	0	0	426	0	0
27	0	0	127	0	0	227	0	0	327	0	0	427	0	0
28	0	0	128	0	0	228	0	0	328	0	0	428	0	0
29	0	0	129	0	0	229	0	0	329	0	0	429	0	0
30	0	0	130	0	0	230	0	0	330	0	0	430	0	0
31	0	0	131	0	0	231	0	0	331	0	0	431	0	0
32	0	0	132	0	0	232	0	0	332	0	0	432	0	0
33	0	0	133	0	0	233	0	0	333	0	0	433	0	0
34	0	0	134	0	0	234	0	0	334	0	0	434	0	0
35	0	0	135	0	0	235	0	0	335	0	0	435	0	0
36	0	0	136	0	0	236	0	0	336	0	0	436	0	0
37	0	0	137	0	0	237	0	0	337	0	0	437	0	0
38	0	0	138	0	0	238	0	0	338	0	0	438	0	0
39	0	0	139	0	0	239	0	0	339	0	0	439	0	0
40	0	0	140	0	0	240	0	0	340	0	0	440	0	0
41	0	0	141	0	0	241	0	0	341	0	0	441	0	0
42	0	0	142	0	0	242	0	0	342	0	0	442	0	0
43	0	0	143	0	0	243	0	0	343	0	0	443	0	0
44	0	0	144	0	0	244	0	0	344	0	0	444	0	0
45	0	0	145	0	0	245	0	0	345	0	0	445	0	0
46	0	0	146	0	0	246	0	0	346	0	0	446	0	0
47	0	0	147	0	0	247	0	0	347	0	0	447	0	0
48	0	0	148	0	0	248	0	0	348	0	0	448	0	0
49	0	0	149	0	0	249	0	0	349	0	0	449	0	0
50	0	0	150	0	0	250	0	0	350	0	0	450	0	0
51	0	0	151	0	0	251	0	0	351	0	0	451	0	0
52	0	0	152	0	0	252	0	0	352	0	0	452	0	0
53	0	0	153	0	0	253	0	0	353	0	0	453	0	0
54	0	0	154	0	0	254	0	0	354	0	0	454	0	0
55	0	0	155	0	0	255	0	0	355	0	0	455	0	0
56	0	0	156	0	0	256	0	0	356	0	0	456	0	0
57	0	0	157	0	0	257	0	0	357	0	0	457	0	0
58	0	0	158	0	0	258	0	0	358	0	0	458	0	0
59	0	0	159	0	0	259	0	0	359	0	0	459	0	0
60	0	0	160	0	0	260	0	0	360	0	0	460	0	0
61	0	0	161	0	0	261	0	0	361	0	0	461	0	0
62	0	0	162	0	0	262	0	0	362	0	0	462	0	0
63	0	0	163	0	0	263	0	0	363	0	0	463	0	0
64	0	0	164	0	0	264	0	0	364	0	0	464	0	0
65	0	0	165	0	0	265	0	0	365	0	0	465	0	0
66	0	0	166	0	0	266	0	0	366	0	0	466	0	0
67	0	0	167	0	0	267	0	0	367	0	0	467	0	0
68	0	0	168	0	0	268	0	0	368	0	0	468	0	0
69	0	0	169	0	0	269	0	0	369	0	0	469	0	0
70	0	0	170	0	0	270	0	0	370	0	0	470	0	0
71	0	0	171	0	0	271	0	0	371	0	0	471	0	0
72	0	0	172	0	0	272	0	0	372	0	0	472	0	0
73	0	0	173	0	0	273	0	0	373	0	0	473	0	0
74	0	0	174	0	0	274	0	0	374	0	0	474	0	0
75	0	0	175	0	0	275	0	0	375	0	0	475	0	0
76	0	0	176	0	0	276	0	0	376	0	0	476	0	0
77	0	0	177	0	0	277	0	0	377	0	0	477	0	0
78	0	0	178	0	0	278	0	0	378	0	0	478	0	0
79	0	0	179	0	0	279	0	0	379	0	0	479	0	0
80	0	0	180	0	0	280	0	0	380	0	0	480	0	0
81	0	0	181	0	0	281	0	0	381	0	0	481	0	0
82	0	0	182	0	0	282	0	0	382	0	0	482	0	0
83	0	0	183	0	0	283	0	0	383	0	0	483	0	0
84	0	0	184	0	0	284	0	0	384	0	0	484	0	0
85	0	0	185	0	0	285	0	0	385	0	0	485	0	0
86	0	0	186	0	0	286	0	0	386	0	0	486	0	0
87	0	0	187	0	0	287	0	0	387	0	0	487	0	0
88	0	0	188	0	0	288	0	0	388	0	0	488	0	0
89	0	0	189	0	0	289	0	0	389	0	0	489	0	0
90	0	0	190	0	0	290	0	0	390	0	0	490	0	0
91	0	0	191	0	0	291	0	0	391	0	0	491	0	0
92	0	0	192	0	0	292	0	0	392	0	0	492	0	0
93	0	0	193	0	0	293	0	0	393	0	0	493	0	0
94	0	0	194	0	0	294	0	0	394	0	0	494	0	0
95	0	0	195	0	0	295	0	0	395	0	0	495	0	0
96	0	0	196	0	0	296	0	0	396	0	0	496	0	0
97	0	0	197	0	0	297	0	0	397	0	0	497	0	0
98	0	0	198	0	0	298	0	0	398	0	0	498	0	0
99	0	0	199	0	0	299	0	0	399	0	0	499	0	0
100	0	0	200	0	0	300	0	0	400	0	0	500	0	0

Resultados do ensaio de adesão a tecido epitelial de sistema de glândula mamária

Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo
311MB		11	311MB		11	311MB		11	311MB		11	311MB		11
Cálcus	Bactérias aderentes		Cálcus	Bactérias aderentes		Cálcus	Bactérias aderentes		Cálcus	Bactérias aderentes		Cálcus	Bactérias aderentes	
501	0	0	501	0	0	701	0	0	801	0	0	901	0	0
502	0	0	502	0	0	702	0	0	802	0	0	902	0	0
503	0	0	503	0	0	703	0	0	803	0	0	903	0	0
504	0	0	504	0	0	704	0	0	804	0	0	904	0	0
505	0	0	505	0	0	705	0	0	805	0	0	905	0	0
506	0	0	506	0	0	706	0	0	806	0	0	906	0	0
507	0	0	507	0	0	707	0	0	807	0	0	907	0	0
508	0	0	508	0	0	708	0	0	808	0	0	908	0	0
509	0	0	509	0	0	709	0	0	809	0	0	909	0	0
510	0	0	510	0	0	710	0	0	810	0	0	910	0	0
511	0	0	511	0	0	711	0	0	811	0	0	911	0	0
512	0	0	512	0	0	712	0	0	812	0	0	912	0	0
513	0	0	513	0	0	713	0	0	813	0	0	913	0	0
514	0	0	514	0	0	714	0	0	814	0	0	914	0	0
515	0	0	515	0	0	715	0	0	815	0	0	915	0	0
516	0	0	516	0	0	716	0	0	816	0	0	916	0	0
517	0	0	517	0	0	717	0	0	817	0	0	917	0	0
518	0	0	518	0	0	718	0	0	818	0	0	918	1	0
519	0	0	519	0	0	719	0	0	819	0	0	919	0	0
520	0	0	520	0	0	720	0	0	820	0	0	920	0	0
521	0	0	521	0	0	721	0	0	821	0	0	921	0	0
522	0	0	522	0	0	722	0	0	822	0	0	922	0	0
523	0	0	523	0	0	723	0	0	823	0	0	923	0	0
524	0	0	524	0	0	724	0	0	824	0	0	924	0	0
525	0	0	525	0	0	725	0	0	825	0	0	925	0	0
526	0	0	526	0	0	726	0	0	826	0	0	926	0	0
527	0	0	527	0	0	727	0	0	827	0	0	927	0	0
528	0	0	528	0	0	728	0	0	828	0	0	928	0	0
529	0	0	529	0	0	729	0	0	829	0	0	929	0	0
530	0	0	530	0	0	730	0	0	830	0	0	930	0	0
531	0	0	531	0	0	731	0	0	831	0	0	931	0	0
532	0	0	532	0	0	732	0	0	832	0	0	932	0	0
533	0	0	533	0	0	733	0	0	833	2	0	933	0	0
534	0	0	534	0	0	734	0	0	834	0	0	934	0	0
535	0	0	535	0	0	735	0	0	835	0	0	935	0	0
536	0	0	536	0	0	736	0	0	836	0	0	936	0	0
537	0	0	537	0	0	737	0	0	837	0	0	937	0	0
538	0	0	538	0	0	738	0	0	838	1	0	938	0	0
539	0	0	539	0	0	739	0	0	839	0	0	939	0	0
540	0	0	540	0	0	740	0	0	840	0	0	940	0	0
541	0	0	541	0	0	741	0	0	841	0	0	941	0	0
542	0	0	542	0	0	742	0	0	842	0	0	942	0	0
543	0	0	543	0	0	743	0	0	843	0	0	943	0	0
544	0	0	544	0	0	744	0	0	844	0	0	944	0	0
545	0	0	545	0	0	745	0	0	845	0	0	945	0	0
546	0	0	546	0	0	746	0	0	846	0	0	946	0	0
547	0	0	547	0	0	747	0	0	847	0	0	947	0	0
548	0	0	548	0	0	748	0	0	848	0	0	948	0	0
549	0	0	549	0	0	749	0	0	849	0	0	949	0	0
550	0	0	550	0	0	750	0	0	850	0	0	950	0	0
551	0	0	551	0	0	751	0	0	851	0	0	951	0	0
552	0	0	552	0	0	752	0	0	852	0	0	952	0	0
553	0	0	553	0	0	753	0	0	853	0	0	953	0	0
554	0	0	554	0	0	754	0	0	854	0	0	954	0	0
555	0	0	555	0	0	755	0	0	855	0	0	955	0	0
556	0	0	556	0	0	756	0	0	856	0	0	956	0	0
557	0	0	557	0	0	757	0	0	857	0	0	957	0	0
558	0	0	558	0	0	758	0	0	858	0	0	958	0	0
559	0	0	559	0	0	759	0	0	859	0	0	959	0	0
560	0	0	560	0	0	760	0	0	860	0	0	960	0	0
561	0	0	561	0	0	761	0	0	861	0	0	961	0	0
562	0	0	562	0	0	762	0	0	862	0	0	962	0	0
563	0	0	563	0	0	763	0	0	863	0	0	963	0	0
564	0	0	564	0	0	764	0	0	864	0	0	964	0	0
565	0	0	565	0	0	765	0	0	865	0	0	965	0	0
566	0	0	566	0	0	766	0	0	866	0	0	966	0	0
567	0	0	567	0	0	767	0	0	867	0	0	967	0	0
568	0	0	568	0	0	768	0	0	868	0	0	968	0	0
569	0	0	569	0	0	769	0	0	869	0	0	969	0	0
570	0	0	570	0	0	770	0	0	870	0	0	970	0	0
571	0	0	571	0	0	771	0	0	871	0	0	971	0	0
572	0	0	572	0	0	772	0	0	872	0	0	972	0	0
573	0	0	573	0	0	773	0	0	873	0	0	973	0	0
574	0	0	574	0	0	774	0	0	874	0	0	974	0	0
575	0	0	575	0	0	775	0	0	875	0	0	975	0	0
576	0	0	576	0	0	776	0	0	876	0	0	976	0	0
577	0	0	577	0	0	777	0	0	877	0	0	977	0	0
578	0	0	578	0	0	778	0	0	878	0	0	978	0	0
579	0	0	579	0	0	779	0	0	879	0	0	979	0	0
580	0	0	580	0	0	780	0	0	880	0	0	980	0	0
581	0	0	581	0	0	781	0	0	881	0	0	981	0	0
582	0	0	582	0	0	782	0	0	882	0	0	982	0	0
583	0	0	583	0	0	783	0	0	883	0	0	983	0	0
584	0	0	584	0	0	784	0	0	884	0	0	984	0	0
585	0	0	585	0	0	785	0	0	885	0	0	985	0	0
586	0	0	586	0	0	786	0	0	886	0	0	986	0	0
587	0	0	587	0	0	787	0	0	887	0	0	987	0	0
588	0	0	588	0	0	788	0	0	888	0	0	988	0	0
589	0	0	589	0	0	789	0	0	889	0	0	989	0	0
590	0	0	590	0	0	790	0	0	890	0	0	990	0	0
591	0	0	591	0	0	791	0	0	891	0	0	991	0	0
592	0	0	592	0	0	792	0	0	892	0	0	992	0	0
593	0	0	593	0	0	793	0	0	893	0	0	993	0	0
594	0	0	594	0	0	794	0	0	894	0	0	994	0	0
595	0	0	595	0	0	795	0	0	895	0	0	995	0	0
596	0	0	596	0	0	796	0	0	896	0	0	996	0	0
597	0	0	597	0	0	797	0	0	897	0	0	997	0	0
598	0	0	598	0	0	798	0	0	898	0	0	998	0	0
599	0	0	599	0	0	799	0	0	899	0	0	999	0	0
600	0	0	600	0	0	800	0	0	900	0	0	1000	0	0

Resultados do ensaio de adesão a tecido epitelial da cisterna da glândula mamária

Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo
329MB		11	329MB		11	329MB		11	329MB		11	329MB		11
Cálculos	Reações aderentes		Cálculos	Reações aderentes		Cálculos	Reações aderentes		Cálculos	Reações aderentes		Cálculos	Reações aderentes	
1	0		101	0		201	0		301	0		401	0	
2	0		102	0		202	0		302	0		402	0	
3	0		103	0		203	0		303	0		403	0	
4	0		104	0		204	0		304	0		404	0	
5	0		105	0		205	0		305	0		405	0	
6	0		106	0		206	0		306	0		406	0	
7	0		107	0		207	0		307	0		407	0	
8	0		108	0		208	0		308	0		408	0	
9	0		109	0		209	0		309	0		409	0	
10	0		110	0		210	0		310	0		410	0	
11	0		111	0		211	0		311	0		411	0	
12	0		112	0		212	0		312	0		412	0	
13	0		113	0		213	0		313	0		413	0	
14	0		114	0		214	0		314	0		414	0	
15	0		115	0		215	0		315	0		415	0	
16	0		116	0		216	0		316	0		416	0	
17	0		117	0		217	0		317	0		417	0	
18	0		118	0		218	0		318	0		418	0	
19	0		119	0		219	0		319	0		419	0	
20	0		120	0		220	0		320	0		420	0	
21	0		121	0		221	0		321	0		421	0	
22	0		122	0		222	0		322	0		422	0	
23	0		123	0		223	0		323	0		423	0	
24	0		124	0		224	0		324	0		424	0	
25	0		125	0		225	0		325	0		425	0	
26	0		126	0		226	0		326	0		426	0	
27	0		127	0		227	0		327	0		427	0	
28	0		128	0		228	0		328	0		428	0	
29	0		129	0		229	0		329	0		429	0	
30	0		130	0		230	0		330	0		430	0	
31	0		131	0		231	0		331	0		431	0	
32	0		132	0		232	0		332	0		432	0	
33	0		133	0		233	0		333	0		433	0	
34	0		134	0		234	0		334	0		434	0	
35	0		135	0		235	0		335	0		435	0	
36	0		136	0		236	0		336	0		436	0	
37	0		137	0		237	0		337	0		437	0	
38	0		138	0		238	0		338	0		438	0	
39	0		139	0		239	0		339	0		439	0	
40	0		140	0		240	0		340	0		440	0	
41	0		141	0		241	0		341	0		441	0	
42	0		142	0		242	0		342	0		442	0	
43	0		143	0		243	0		343	0		443	0	
44	0		144	0		244	0		344	0		444	0	
45	0		145	0		245	0		345	0		445	0	
46	0		146	0		246	0		346	0		446	0	
47	0		147	0		247	0		347	0		447	0	
48	0		148	0		248	0		348	0		448	0	
49	0		149	0		249	0		349	0		449	0	
50	0		150	0		250	0		350	0		450	0	
51	0		151	0		251	0		351	0		451	0	
52	0		152	0		252	0		352	0		452	0	
53	0		153	0		253	0		353	0		453	0	
54	0		154	0		254	0		354	0		454	0	
55	0		155	0		255	0		355	0		455	0	
56	0		156	0		256	0		356	0		456	0	
57	0		157	0		257	0		357	0		457	0	
58	0		158	0		258	0		358	0		458	0	
59	0		159	0		259	0		359	0		459	0	
60	0		160	0		260	0		360	0		460	0	
61	0		161	0		261	0		361	0		461	0	
62	0		162	0		262	0		362	0		462	0	
63	0		163	0		263	0		363	0		463	0	
64	0		164	0		264	0		364	0		464	0	
65	0		165	0		265	0		365	0		465	0	
66	0		166	0		266	0		366	0		466	0	
67	0		167	0		267	0		367	0		467	0	
68	0		168	0		268	0		368	0		468	0	
69	0		169	0		269	0		369	0		469	0	
70	0		170	0		270	0		370	0		470	0	
71	0		171	0		271	0		371	0		471	0	
72	0		172	0		272	0		372	0		472	0	
73	0		173	0		273	0		373	0		473	0	
74	0		174	0		274	0		374	0		474	0	
75	0		175	0		275	0		375	0		475	0	
76	0		176	0		276	0		376	0		476	0	
77	0		177	0		277	0		377	0		477	0	
78	0		178	0		278	0		378	0		478	0	
79	0		179	0		279	0		379	0		479	0	
80	0		180	0		280	0		380	0		480	0	
81	0		181	0		281	0		381	0		481	0	
82	0		182	0		282	0		382	0		482	0	
83	0		183	0		283	0		383	0		483	0	
84	0		184	0		284	0		384	0		484	0	
85	0		185	0		285	0		385	0		485	0	
86	0		186	0		286	0		386	0		486	0	
87	0		187	0		287	0		387	0		487	0	
88	0		188	0		288	0		388	0		488	0	
89	0		189	0		289	0		389	0		489	0	
90	0		190	0		290	0		390	0		490	0	
91	0		191	0		291	0		391	0		491	0	
92	0		192	0		292	0		392	0		492	0	
93	0		193	0		293	0		393	0		493	0	
94	0		194	0		294	0		394	0		494	0	
95	0		195	0		295	0		395	0		495	0	
96	0		196	0		296	0		396	0		496	0	
97	0		197	0		297	0		397	0		497	0	
98	0		198	0		298	0		398	0		498	0	
99	0		199	0		299	0		399	0		499	0	
100	0		200	0		300	0		400	0		500	0	

Resultados do ensaio de adesão a tecido epitelial da osteroa da glândula mamária

Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo
320MB		11	320MB		11	320MB		11	320MB		11	320MB		11
Cálculos	Bactérias aderentes		Cálculos	Bactérias aderentes		Cálculos	Bactérias aderentes		Cálculos	Bactérias aderentes		Cálculos	Bactérias aderentes	
501	0		601	0		701	0		801	0		901	0	
502	0		602	0		702	0		802	0		902	0	
503	0		603	0		703	0		803	0		903	0	
504	0		604	0		704	0		804	0		904	0	
505	0		605	0		705	0		805	0		905	0	
506	0		606	0		706	0		806	0		906	0	
507	0		607	0		707	0		807	0		907	0	
508	0		608	0		708	0		808	0		908	0	
509	0		609	0		709	0		809	0		909	0	
510	0		610	0		710	0		810	0		910	0	
511	0		611	0		711	0		811	0		911	0	
512	0		612	0		712	0		812	0		912	0	
513	0		613	0		713	0		813	0		913	0	
514	0		614	0		714	0		814	0		914	0	
515	0		615	0		715	0		815	0		915	0	
516	0		616	0		716	0		816	0		916	0	
517	0		617	0		717	0		817	0		917	0	
518	0		618	0		718	0		818	0		918	0	
519	0		619	0		719	0		819	0		919	0	
520	0		620	0		720	0		820	0		920	0	
521	0		621	0		721	0		821	0		921	0	
522	0		622	0		722	0		822	0		922	0	
523	0		623	0		723	0		823	0		923	0	
524	0		624	0		724	0		824	0		924	0	
525	0		625	0		725	0		825	0		925	0	
526	0		626	0		726	0		826	0		926	0	
527	0		627	0		727	0		827	0		927	0	
528	0		628	0		728	0		828	0		928	0	
529	0		629	0		729	0		829	0		929	0	
530	0		630	0		730	0		830	0		930	0	
531	0		631	0		731	0		831	0		931	0	
532	0		632	0		732	0		832	0		932	0	
533	0		633	0		733	0		833	0		933	0	
534	0		634	0		734	0		834	0		934	0	
535	0		635	0		735	0		835	0		935	0	
536	0		636	0		736	0		836	0		936	0	
537	0		637	0		737	0		837	0		937	0	
538	0		638	0		738	0		838	0		938	0	
539	0		639	0		739	0		839	0		939	0	
540	0		640	0		740	0		840	0		940	0	
541	0		641	0		741	0		841	0		941	0	
542	0		642	0		742	0		842	0		942	0	
543	0		643	0		743	0		843	0		943	0	
544	0		644	0		744	0		844	0		944	0	
545	0		645	0		745	0		845	0		945	0	
546	0		646	0		746	0		846	0		946	0	
547	0		647	0		747	0		847	0		947	0	
548	0		648	0		748	0		848	0		948	0	
549	0		649	0		749	0		849	0		949	0	
550	0		650	0		750	0		850	0		950	0	
551	0		651	0		751	0		851	0		951	0	
552	0		652	0		752	0		852	0		952	0	
553	0		653	0		753	0		853	0		953	0	
554	0		654	0		754	0		854	0		954	0	
555	0		655	0		755	0		855	0		955	0	
556	0		656	0		756	0		856	0		956	0	
557	0		657	0		757	0		857	0		957	0	
558	0		658	0		758	0		858	0		958	0	
559	0		659	0		759	0		859	0		959	0	
560	0		660	0		760	0		860	0		960	0	
561	0		661	0		761	0		861	0		961	0	
562	0		662	0		762	0		862	0		962	0	
563	0		663	0		763	0		863	0		963	0	
564	0		664	0		764	0		864	0		964	0	
565	0		665	0		765	0		865	0		965	0	
566	0		666	0		766	0		866	0		966	0	
567	0		667	0		767	1		867	0		967	0	
568	0		668	0		768	0		868	0		968	0	
569	0		669	0		769	0		869	0		969	0	
570	0		670	0		770	0		870	0		970	0	
571	0		671	0		771	0		871	0		971	0	
572	0		672	0		772	0		872	0		972	0	
573	0		673	0		773	0		873	0		973	0	
574	0		674	0		774	0		874	0		974	0	
575	0		675	0		775	0		875	0		975	0	
576	0		676	0		776	0		876	0		976	0	
577	0		677	0		777	0		877	0		977	0	
578	0		678	0		778	0		878	0		978	0	
579	0		679	0		779	0		879	0		979	0	
580	0		680	0		780	0		880	0		980	0	
581	0		681	0		781	0		881	0		981	0	
582	0		682	0		782	0		882	0		982	0	
583	0		683	0		783	0		883	0		983	0	
584	0		684	0		784	0		884	0		984	0	
585	0		685	0		785	0		885	0		985	0	
586	0		686	0		786	0		886	0		986	0	
587	0		687	0		787	0		887	0		987	0	
588	0		688	0		788	0		888	0		988	0	
589	0		689	0		789	0		889	0		989	0	
590	0		690	0		790	0		890	0		990	0	
591	0		691	0		791	0		891	0		991	0	
592	0		692	0		792	0		892	0		992	0	
593	0		693	0		793	0		893	0		993	0	
594	0		694	0		794	0		894	0		994	0	
595	0		695	0		795	0		895	0		995	0	
596	0		696	0		796	0		896	0		996	0	
597	0		697	0		797	0		897	0		997	0	
598	0		698	0		798	0		898	0		998	0	
599	0		699	0		799	0		899	0		999	0	
600	0		700	0		800	0		900	0		1000	0	





Resultados do ensaio de seleção a tectio epitelial da cisterna da glândula mamária

Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo
2004MB		22	2004MB		22	2004MB		22	2004MB		22
Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes	
501	0		601	0		701	0		801	0	
502	0		602	0		702	0		802	0	
503	0		603	0		703	0		803	0	
504	0		604	0		704	0		804	0	
505	0		605	0		705	0		805	0	
506	0		606	0		706	0		806	0	
507	0		607	0		707	0		807	0	
508	0		608	0		708	0		808	0	
509	0		609	0		709	0		809	0	
510	0		610	0		710	0		810	0	
511	0		611	0		711	0		811	0	
512	0		612	0		712	0		812	0	
513	0		613	0		713	0		813	0	
514	0		614	0		714	0		814	0	
515	0		615	0		715	0		815	0	
516	0		616	0		716	0		816	0	
517	0		617	0		717	0		817	0	
518	0		618	0		718	0		818	0	
519	0		619	0		719	0		819	0	
520	0		620	0		720	0		820	0	
521	0		621	0		721	0		821	0	
522	0		622	0		722	0		822	0	
523	0		623	0		723	0		823	0	
524	0		624	0		724	0		824	0	
525	0		625	0		725	0		825	0	
526	0		626	0		726	0		826	0	
527	0		627	2		727	0		827	0	
528	0		628	0		728	0		828	0	
529	0		629	0		729	0		829	0	
530	0		630	0		730	0		830	0	
531	0		631	0		731	0		831	0	
532	0		632	0		732	0		832	0	
533	0		633	0		733	0		833	0	
534	0		634	0		734	0		834	0	
535	0		635	0		735	0		835	0	
536	0		636	0		736	0		836	0	
537	0		637	0		737	0		837	0	
538	0		638	0		738	0		838	0	
539	0		639	0		739	0		839	0	
540	0		640	0		740	0		840	0	
541	0		641	0		741	0		841	0	
542	0		642	0		742	0		842	0	
543	0		643	0		743	0		843	0	
544	0		644	0		744	0		844	0	
545	0		645	0		745	0		845	0	
546	0		646	0		746	0		846	0	
547	0		647	0		747	0		847	0	
548	0		648	0		748	0		848	0	
549	0		649	0		749	0		849	0	
550	0		650	0		750	0		850	0	
551	0		651	0		751	0		851	0	
552	0		652	0		752	0		852	0	
553	0		653	0		753	0		853	0	
554	0		654	0		754	0		854	0	
555	0		655	0		755	0		855	0	
556	0		656	0		756	0		856	0	
557	0		657	0		757	0		857	0	
558	0		658	0		758	0		858	0	
559	0		659	0		759	0		859	0	
560	0		660	0		760	0		860	0	
561	0		661	0		761	0		861	0	
562	0		662	0		762	0		862	0	
563	0		663	0		763	0		863	0	
564	0		664	0		764	0		864	0	
565	0		665	0		765	0		865	0	
566	0		666	0		766	0		866	0	
567	0		667	0		767	0		867	0	
568	0		668	0		768	0		868	0	
569	0		669	0		769	0		869	0	
570	0		670	0		770	0		870	0	
571	0		671	0		771	0		871	0	
572	0		672	0		772	0		872	0	
573	0		673	0		773	0		873	0	
574	0		674	0		774	0		874	0	
575	0		675	0		775	0		875	0	
576	0		676	0		776	0		876	0	
577	0		677	0		777	0		877	0	
578	0		678	0		778	0		878	0	
579	0		679	0		779	0		879	0	
580	0		680	0		780	0		880	0	
581	0		681	0		781	0		881	0	
582	0		682	0		782	0		882	0	
583	0		683	0		783	0		883	0	
584	0		684	0		784	0		884	0	
585	0		685	0		785	0		885	0	
586	0		686	0		786	0		886	0	
587	0		687	0		787	0		887	0	
588	0		688	0		788	0		888	0	
589	0		689	0		789	0		889	0	
590	0		690	0		790	0		890	0	
591	0		691	0		791	0		891	0	
592	0		692	0		792	0		892	0	
593	0		693	0		793	0		893	0	
594	0		694	0		794	0		894	0	
595	0		695	0		795	0		895	0	
596	0		696	0		796	0		896	0	
597	0		697	0		797	0		897	0	
598	0		698	0		798	0		898	0	
599	0		699	0		799	0		899	0	
600	0		700	0		800	0		900	0	

Resultados do anelido de adoção a tecido epitelial da cisterna da glândula mamária

Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo
309ME		22	309ME		22	309ME		22	309ME		22
Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes		Células	Bactérias aderentes	
1	0	2	101	0		201	0		301	0	401
2	0	0	102	0		202	0		302	0	402
3	0	0	103	0		203	0		303	0	403
4	0	0	104	0		204	0		304	0	404
5	0	0	105	0		205	0		305	0	405
6	0	0	106	1		206	0		306	0	406
7	0	0	107	0		207	0		307	0	407
8	0	0	108	0		208	0		308	0	408
9	0	0	109	0		209	0		309	0	409
10	0	0	110	0		210	0		310	0	410
11	0	0	111	0		211	0		311	0	411
12	0	0	112	0		212	0		312	0	412
13	0	0	113	0		213	0		313	0	413
14	0	0	114	0		214	0		314	0	414
15	0	0	115	0		215	0		315	0	415
16	0	0	116	0		216	0		316	0	416
17	0	0	117	0		217	0		317	0	417
18	0	0	118	0		218	0		318	0	418
19	0	0	119	0		219	0		319	0	419
20	0	0	120	0		220	0		320	0	420
21	0	0	121	0		221	0		321	0	421
22	0	0	122	0		222	0		322	0	422
23	0	0	123	0		223	0		323	0	423
24	0	0	124	0		224	0		324	0	424
25	0	0	125	0		225	0		325	0	425
26	0	0	126	0		226	0		326	0	426
27	0	0	127	0		227	0		327	0	427
28	0	0	128	0		228	0		328	0	428
29	0	0	129	0		229	0		329	0	429
30	0	0	130	0		230	0		330	0	430
31	0	0	131	0		231	0		331	0	431
32	0	0	132	0		232	0		332	0	432
33	0	0	133	0		233	0		333	0	433
34	0	0	134	0		234	0		334	0	434
35	0	0	135	0		235	0		335	0	435
36	0	0	136	0		236	0		336	0	436
37	0	0	137	0		237	0		337	0	437
38	0	0	138	0		238	0		338	0	438
39	0	0	139	0		239	0		339	0	439
40	0	0	140	0		240	0		340	0	440
41	0	0	141	0		241	0		341	0	441
42	0	0	142	0		242	0		342	0	442
43	0	0	143	0		243	0		343	0	443
44	0	0	144	0		244	0		344	0	444
45	0	0	145	0		245	0		345	0	445
46	0	0	146	0		246	0		346	0	446
47	0	0	147	0		247	0		347	0	447
48	0	0	148	0		248	0		348	0	448
49	0	0	149	0		249	0		349	0	449
50	0	0	150	0		250	0		350	0	450
51	0	0	151	0		251	0		351	0	451
52	0	0	152	0		252	0		352	0	452
53	0	0	153	0		253	0		353	0	453
54	0	0	154	0		254	0		354	0	454
55	0	0	155	0		255	0		355	0	455
56	0	0	156	0		256	0		356	0	456
57	0	0	157	0		257	0		357	0	457
58	0	0	158	0		258	0		358	0	458
59	0	0	159	0		259	0		359	0	459
60	0	0	160	0		260	0		360	0	460
61	0	0	161	0		261	0		361	0	461
62	0	0	162	0		262	0		362	0	462
63	0	0	163	0		263	0		363	0	463
64	0	0	164	0		264	0		364	0	464
65	0	0	165	0		265	0		365	0	465
66	0	0	166	0		266	0		366	0	466
67	0	0	167	0		267	0		367	0	467
68	0	0	168	0		268	0		368	0	468
69	0	0	169	0		269	0		369	0	469
70	0	0	170	0		270	0		370	0	470
71	0	0	171	0		271	0		371	0	471
72	0	0	172	0		272	0		372	0	472
73	0	0	173	0		273	0		373	0	473
74	0	0	174	0		274	0		374	0	474
75	0	0	175	0		275	0		375	0	475
76	0	0	176	0		276	0		376	0	476
77	0	0	177	0		277	0		377	0	477
78	0	0	178	0		278	0		378	0	478
79	0	0	179	0		279	0		379	0	479
80	0	0	180	0		280	0		380	0	480
81	0	0	181	0		281	0		381	0	481
82	0	0	182	0		282	0		382	0	482
83	0	0	183	0		283	0		383	0	483
84	0	0	184	0		284	0		384	0	484
85	0	0	185	0		285	0		385	0	485
86	0	0	186	0		286	0		386	0	486
87	0	0	187	0		287	0		387	0	487
88	0	0	188	0		288	0		388	0	488
89	0	0	189	0		289	0		389	0	489
90	0	0	190	0		290	0		390	0	490
91	0	0	191	0		291	0		391	0	491
92	0	0	192	0		292	0		392	0	492
93	0	0	193	3		293	0		393	0	493
94	0	0	194	0		294	0		394	0	494
95	0	0	195	0		295	0		395	0	495
96	0	0	196	0		296	0		396	0	496
97	0	0	197	0		297	0		397	0	497
98	0	0	198	0		298	0		398	0	498
99	0	0	199	0		299	0		399	0	499
100	0	0	200	0		300	0		400	0	500

Resultados do ensaio de adesão a tecido epitelial de cisternas de glândula mamária

Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo
309ME		22	309ME		22	309ME		22	309ME		22	309ME		22
Cálcus	Bactérias aderentes		Cálcus	Bactérias aderentes		Cálcus	Bactérias aderentes		Cálcus	Bactérias aderentes		Cálcus	Bactérias aderentes	
501	0		601	0		701	0		801	0		901	0	
502	0		602	0		702	0		802	0		902	0	
503	0		603	0		703	0		803	0		903	0	
504	0		604	0		704	0		804	0		904	0	
505	0		605	0		705	0		805	0		905	0	
506	0		606	0		706	0		806	0		906	0	
507	0		607	0		707	0		807	0		907	0	
508	0		608	0		708	0		808	0		908	0	
509	0		609	0		709	0		809	0		909	0	
510	0		610	0		710	0		810	0		910	0	
511	0		611	0		711	0		811	0		911	1	
512	0		612	0		712	0		812	0		912	0	
513	0		613	0		713	0		813	0		913	0	
514	0		614	0		714	0		814	0		914	0	
515	0		615	0		715	0		815	0		915	0	
516	0		616	0		716	0		816	0		916	0	
517	0		617	0		717	0		817	0		917	0	
518	0		618	0		718	0		818	0		918	0	
519	0		619	0		719	0		819	0		919	0	
520	0		620	0		720	0		820	0		920	0	
521	0		621	0		721	0		821	0		921	0	
522	0		622	0		722	0		822	0		922	0	
523	0		623	0		723	0		823	0		923	0	
524	0		624	0		724	0		824	0		924	0	
525	0		625	0		725	0		825	0		925	0	
526	0		626	0		726	0		826	0		926	0	
527	0		627	0		727	0		827	0		927	0	
528	0		628	0		728	0		828	0		928	0	
529	0		629	0		729	0		829	0		929	0	
530	0		630	0		730	0		830	0		930	0	
531	0		631	0		731	0		831	0		931	0	
532	0		632	0		732	0		832	0		932	0	
533	0		633	0		733	0		833	0		933	0	
534	0		634	0		734	0		834	0		934	1	
535	0		635	0		735	0		835	0		935	0	
536	0		636	0		736	0		836	0		936	0	
537	0		637	0		737	0		837	0		937	0	
538	0		638	0		738	0		838	0		938	0	
539	0		639	0		739	0		839	0		939	0	
540	0		640	0		740	0		840	0		940	0	
541	0		641	0		741	0		841	0		941	0	
542	0		642	0		742	0		842	0		942	0	
543	0		643	0		743	0		843	0		943	0	
544	0		644	0		744	0		844	0		944	0	
545	0		645	0		745	0		845	0		945	0	
546	0		646	0		746	0		846	0		946	0	
547	0		647	0		747	0		847	0		947	0	
548	0		648	0		748	0		848	0		948	0	
549	0		649	0		749	0		849	0		949	0	
550	0		650	0		750	0		850	0		950	0	
551	0		651	0		751	0		851	0		951	0	
552	0		652	0		752	0		852	0		952	0	
553	0		653	0		753	0		853	0		953	0	
554	0		654	0		754	0		854	0		954	0	
555	0		655	0		755	0		855	0		955	0	
556	0		656	0		756	0		856	0		956	0	
557	0		657	6		757	0		857	0		957	0	
558	0		658	0		758	0		858	0		958	0	
559	0		659	0		759	0		859	0		959	0	
560	0		660	0		760	0		860	0		960	0	
561	0		661	0		761	0		861	0		961	0	
562	0		662	0		762	0		862	0		962	0	
563	0		663	0		763	0		863	0		963	0	
564	0		664	0		764	0		864	0		964	0	
565	0		665	0		765	0		865	0		965	0	
566	0		666	0		766	0		866	0		966	0	
567	0		667	0		767	0		867	0		967	0	
568	0		668	0		768	0		868	0		968	0	
569	0		669	0		769	0		869	0		969	0	
570	0		670	0		770	0		870	0		970	0	
571	0		671	0		771	0		871	0		971	0	
572	0		672	0		772	0		872	0		972	0	
573	0		673	0		773	0		873	0		973	0	
574	0		674	0		774	0		874	0		974	0	
575	0		675	0		775	0		875	0		975	0	
576	0		676	0		776	0		876	0		976	0	
577	0		677	0		777	0		877	0		977	0	
578	0		678	0		778	0		878	0		978	0	
579	0		679	0		779	0		879	0		979	0	
580	0		680	0		780	0		880	0		980	0	
581	0		681	0		781	0		881	0		981	0	
582	0		682	0		782	0		882	0		982	0	
583	0		683	0		783	0		883	0		983	0	
584	0		684	0		784	0		884	0		984	0	
585	0		685	0		785	0		885	0		985	0	
586	0		686	0		786	0		886	0		986	0	
587	0		687	0		787	0		887	0		987	0	
588	0		688	0		788	0		888	0		988	0	
589	0		689	0		789	0		889	0		989	0	
590	0		690	0		790	0		890	0		990	0	
591	0		691	0		791	0		891	0		991	0	
592	0		692	0		792	0		892	0		992	0	
593	0		693	0		793	0		893	0		993	0	
594	0		694	0		794	0		894	0		994	0	
595	0		695	0		795	0		895	4		995	0	
596	0		696	0		796	0		896	0		996	0	
597	0		697	0		797	0		897	0		997	0	
598	0		698	0		798	0		898	0		998	0	
599	0		699	0		799	0		899	0		999	0	
600	0		700	0		800	0		900	0		1000	0	

Resultados do ensaio de ensaio a tracção epistática da câmara de gás de grande capacidade

N.º do animal 11894B		Grupo 33	N.º do animal 11894B		Grupo 33	N.º do animal 11894B		Grupo 33	N.º do animal 11894B		Grupo 33	N.º do animal 11894B		Grupo 33
Células	Reacções adversas		Células	Reacções adversas		Células	Reacções adversas		Células	Reacções adversas		Células	Reacções adversas	
1	0		101	0		201	0		301	0		401	0	
2	0		102	0		202	0		302	0		402	0	
3	0		103	0		203	0		303	0		403	0	
4	0		104	0		204	0		304	0		404	0	
5	0		105	0		205	0		305	0		405	0	
6	0		106	0		206	0		306	0		406	0	
7	0		107	0		207	0		307	0		407	0	
8	0		108	0		208	0		308	0		408	0	
9	0		109	0		209	0		309	0		409	0	
10	0		110	2		210	0		310	0		410	0	
11	0		111	0		211	0		311	0		411	0	
12	0		112	0		212	0		312	0		412	0	
13	0		113	0		213	0		313	0		413	0	
14	0		114	0		214	0		314	0		414	0	
15	0		115	0		215	0		315	0		415	0	
16	0		116	0		216	0		316	0		416	0	
17	0		117	0		217	0		317	0		417	0	
18	0		118	0		218	0		318	0		418	0	
19	0		119	0		219	0		319	0		419	0	
20	0		120	0		220	0		320	0		420	0	
21	0		121	0		221	0		321	0		421	0	
22	0		122	0		222	0		322	0		422	0	
23	0		123	0		223	0		323	0		423	0	
24	0		124	0		224	0		324	0		424	0	
25	0		125	0		225	0		325	0		425	0	
26	0		126	0		226	0		326	0		426	0	
27	0		127	0		227	0		327	0		427	0	
28	0		128	0		228	0		328	0		428	0	
29	0		129	0		229	0		329	0		429	0	
30	0		130	0		230	0		330	0		430	0	
31	0		131	0		231	0		331	0		431	0	
32	0		132	0		232	0		332	0		432	0	
33	0		133	0		233	0		333	0		433	0	
34	0		134	0		234	0		334	0		434	0	
35	0		135	0		235	0		335	0		435	0	
36	0		136	0		236	0		336	0		436	0	
37	0		137	0		237	0		337	0		437	0	
38	0		138	0		238	0		338	0		438	0	
39	0		139	0		239	0		339	0		439	0	
40	0		140	0		240	0		340	0		440	1	
41	0		141	0		241	0		341	0		441	0	
42	0		142	0		242	0		342	0		442	0	
43	0		143	0		243	0		343	0		443	0	
44	0		144	0		244	0		344	0		444	0	
45	0		145	0		245	0		345	0		445	0	
46	0		146	0		246	0		346	0		446	0	
47	0		147	0		247	0		347	0		447	0	
48	0		148	0		248	0		348	0		448	0	
49	0		149	0		249	0		349	0		449	0	
50	0		150	0		250	0		350	0		450	0	
51	0		151	0		251	0		351	0		451	0	
52	0		152	0		252	0		352	0		452	0	
53	0		153	0		253	0		353	0		453	0	
54	0		154	0		254	0		354	0		454	0	
55	0		155	0		255	0		355	0		455	0	
56	0		156	0		256	2		356	0		456	0	
57	0		157	0		257	1		357	0		457	0	
58	0		158	0		258	3		358	0		458	0	
59	0		159	0		259	0		359	0		459	0	
60	0		160	0		260	0		360	0		460	0	
61	0		161	0		261	0		361	0		461	0	
62	0		162	0		262	0		362	0		462	0	
63	0		163	0		263	0		363	0		463	0	
64	0		164	0		264	0		364	0		464	0	
65	0		165	0		265	0		365	0		465	0	
66	0		166	0		266	0		366	0		466	0	
67	0		167	0		267	0		367	0		467	0	
68	0		168	0		268	0		368	0		468	0	
69	0		169	0		269	0		369	0		469	0	
70	0		170	0		270	0		370	0		470	0	
71	0		171	0		271	0		371	0		471	2	
72	0		172	0		272	0		372	0		472	0	
73	0		173	0		273	0		373	0		473	1	
74	0		174	0		274	0		374	0		474	0	
75	0		175	0		275	0		375	0		475	0	
76	0		176	0		276	0		376	0		476	0	
77	0		177	0		277	0		377	0		477	0	
78	0		178	0		278	0		378	0		478	0	
79	0		179	0		279	0		379	0		479	0	
80	0		180	0		280	0		380	0		480	0	
81	0		181	0		281	0		381	0		481	0	
82	0		182	0		282	0		382	0		482	0	
83	0		183	0		283	0		383	0		483	0	
84	0		184	0		284	0		384	0		484	0	
85	0		185	0		285	0		385	0		485	0	
86	0		186	0		286	0		386	0		486	0	
87	0		187	0		287	0		387	0		487	0	
88	0		188	0		288	0		388	0		488	0	
89	0		189	0		289	0		389	0		489	0	
90	0		190	0		290	0		390	0		490	0	
91	0		191	0		291	0		391	0		491	0	
92	0		192	0		292	0		392	0		492	0	
93	0		193	0		293	0		393	0		493	0	
94	0		194	0		294	0		394	0		494	0	
95	0		195	0		295	0		395	0		495	0	
96	0		196	0		296	0		396	0		496	0	
97	0		197	0		297	0		397	0		497	0	
98	0		198	0		298	0		398	0		498	0	
99	0		199	0		299	0		399	0		499	0	
100	0		200	0		300	0		400	0		500	0	

Resultados do exame de admissão a faculdade optativa de cátedras de graduação monetária

Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo	Nº do animal		Grupo
1199MB		33	1199MB		33	1199MB		33	1199MB		33
Códego	Respostas alternativas		Códego	Respostas alternativas		Códego	Respostas alternativas		Códego	Respostas alternativas	
801	0		701	0		801	0		801	0	
802	0		702	0		802	0		802	0	
803	0		703	0		803	0		803	0	
804	0		704	0		804	0		804	0	
805	0		705	0		805	0		805	0	
806	0		706	0		806	0		806	0	
807	0		707	0		807	0		807	0	
808	0		708	0		808	0		808	0	
809	0		709	0		809	0		809	0	
810	0		710	0		810	0		810	0	
811	0		711	0		811	0		811	0	
812	0		712	0		812	0		812	0	
813	0		713	0		813	0		813	0	
814	0		714	0		814	0		814	0	
815	0		715	0		815	0		815	0	
816	0		716	0		816	0		816	0	
817	0		717	0		817	0		817	0	
818	0		718	0		818	0		818	0	
819	0		719	0		819	0		819	0	
820	0		720	0		820	0		820	0	
821	0		721	0		821	0		821	0	
822	0		722	0		822	0		822	0	
823	0		723	0		823	0		823	0	
824	0		724	0		824	0		824	0	
825	0		725	0		825	0		825	0	
826	0		726	0		826	0		826	0	
827	0		727	0		827	0		827	0	
828	0		728	0		828	0		828	0	
829	0		729	0		829	0		829	0	
830	0		730	0		830	0		830	0	
831	0		731	0		831	0		831	0	
832	0		732	0		832	0		832	0	
833	0		733	0		833	0		833	0	
834	0		734	0		834	0		834	0	
835	0		735	0		835	0		835	0	
836	0		736	0		836	0		836	0	
837	0		737	0		837	0		837	0	
838	0		738	0		838	0		838	0	
839	0		739	0		839	0		839	0	
840	0		740	0		840	0		840	0	
841	0		741	0		841	0		841	0	
842	0		742	0		842	0		842	0	
843	0		743	0		843	0		843	0	
844	0		744	0		844	0		844	0	
845	0		745	0		845	0		845	0	
846	0		746	0		846	0		846	0	
847	0		747	0		847	0		847	0	
848	0		748	0		848	0		848	0	
849	0		749	0		849	0		849	0	
850	0		750	0		850	0		850	0	
851	0		751	0		851	0		851	0	
852	0		752	0		852	0		852	0	
853	0		753	0		853	0		853	0	
854	0		754	0		854	0		854	0	
855	0		755	0		855	0		855	0	
856	0		756	0		856	0		856	0	
857	0		757	0		857	0		857	0	
858	0		758	0		858	0		858	0	
859	0		759	0		859	0		859	0	
860	0		760	0		860	0		860	0	
861	0		761	0		861	0		861	0	
862	0		762	0		862	0		862	0	
863	0		763	0		863	0		863	0	
864	0		764	0		864	0		864	0	
865	0		765	0		865	0		865	0	
866	0		766	0		866	0		866	0	
867	0		767	0		867	0		867	0	
868	0		768	0		868	0		868	0	
869	0		769	0		869	0		869	0	
870	0		770	0		870	0		870	0	
871	0		771	0		871	0		871	0	
872	0		772	0		872	0		872	0	
873	0		773	0		873	0		873	0	
874	0		774	0		874	0		874	0	
875	0		775	0		875	0		875	0	
876	0		776	0		876	0		876	0	
877	0		777	0		877	0		877	0	
878	0		778	0		878	0		878	0	
879	0		779	0		879	0		879	0	
880	0		780	0		880	0		880	0	
881	0		781	0		881	0		881	0	
882	0		782	0		882	0		882	0	
883	0		783	0		883	0		883	0	
884	0		784	0		884	0		884	0	
885	0		785	0		885	0		885	0	
886	0		786	0		886	0		886	0	
887	0		787	0		887	0		887	0	
888	0		788	0		888	0		888	0	
889	0		789	0		889	0		889	0	
890	0		790	0		890	0		890	0	
891	0		791	0		891	0		891	0	
892	0		792	0		892	0		892	0	
893	0		793	0		893	0		893	0	
894	0		794	0		894	0		894	0	
895	0		795	0		895	0		895	0	
896	0		796	0		896	0		896	0	
897	0		797	0		897	0		897	0	
898	0		798	0		898	0		898	0	
899	0		799	0		899	0		899	0	
900	0		800	0		900	0		900	0	



