MARIA GABRIELA BARBOSA LIMA

Perfil das citocinas no prognóstico da mamite bovina após antibioticoterapia

São Paulo

2014

MARIA GABRIELA BARBOSA LIMA

Perfil das citocinas no prognóstico da mamite bovina após antibioticoterapia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientadora:
Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2952
FMVZ

Lima, Maria Gabriela Barbosa
Perfil das citocinas no prognóstico da mamite bovina após antibioticoterapia / Maria Gabriela Barbosa Lima. -- 2014.
85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera.

1. Resposta imune. 2. Mamite. 3. Prognóstico. 4. Tratamento. 5. Vacas leiteiras. I. Título.

ERRATA

BARBOSA LIMA, M. G. **Perfil das citocinas no prognóstico da mamite bovina após antibioticoterapia.** 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	Lima, Maria Gabriela Barbosa	Barbosa Lima, Maria Gabriela

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Perfil das citocinas no prognóstico da mamite bovina após antibioticoterapia", protocolado sob o nº 2435, utilizando 160 (cento e sessenta) vacas, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/9/2011.

We certify that the Research "Profile of cytokines in predicting bovine mastitis following antibiotic therapy", protocol number 2435, utilizing 160 (one hundred sixty) cows, under the responsibility Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/21/2011.

São Paulo, 21 de setembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BARBOSA LIMA, Maria Gabriela

Título: Perfil das citocinas no prognóstico da mamite bovina após antibioticoterapia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Aos meus pais, Cicero e Margarida, meus irmãos, Marcelo e Caú e todos os meus sobrinhos, que são a base da minha vida e do meu crescimento, amo muito vocês...

Agradecimentos

À FAPESP que financiou este trabalho, possibilitando sua realização;

À minha mãe que sempre me apoiou em todas as etapas dessa caminha, ajudando, aconselhando, dando broncas sempre com muita paciência e com muito amor;

À minha irmã que ajudou em tudo que pode, transmitindo toda experiência e força que tem.

Aos meus pais que me ajudaram de todas as maneiras que puderam para que eu conseguisse concluir o trabalho.

À meu marido Fabiano, que com muito amor, carinho e, principalmente, paciência, acompanhou toda essa trajetória me apoiando sempre com todo amor e compreensão! Te amo muito!

As minhas amigas que me ajudaram com boas risadas e conversas nos momentos difíceis, compreendendo minhas ausências em eventos, amo vocês.

À minha orientadora Alice Della Libera por todo ensinamento, carinho, paciência e amor transmitido nesse período. Alice você foi uma mãe, um exemplo de profissionalismo, ética e conduta. Obrigada por poder fazer parte da sua equipe;

À Maiara Garcia Blagitz por todo apoio dado durante o experimento e na confecção da tese, Obrigada Má, por ter passado suas experiências para mim!!

À Heloisa Godoi Bertagnon, que foi extremamente importante durante esse tempo de convivência. Helô, muito obrigada por todas as ajudas, conversas, risadas, ensinamentos, almoço, "trabalhos motivacionais"...

À Camila Freitas Batista por toda ajuda amizade, alegria, conhecimento e coisas boas que você me transmitiu em todo esse período. Obrigada por tudo Cá, você foi muito especial!!

À Renata Caminha Gomes por toda ajuda ao longo de todo o processo, pela amizade foi construída ao longo da nossa convivência, pelas bronquinhas importantíssima que você me deu e pelas boas risadas que demos juntos! Adoro muito vc Rê!!

À Bruna Parapinski dos Santos, que me fez tomar gosto pela pesquisa durante o mestrado dela e, mesmo de longe, sempre esteve presente para ajudar, conversar, desabafar...

À Kamila Santos Reis, que apesar do puoco tempo de convivência, pude perceber a pessoa boa , calma e amiga que vc é! Obrigada por tudo!!

À Carolina De Lara Schecaira pela ajuda na minha chegada à Pirassununga que me mostrou um pouco do "caminho das pedras" e das coisas boas de lá!! Obrigada por toda ajuda Carol!

À Melina Marie Yasuoka, Flavio Minieri Marchese e Vanessa Storillo por todo apoio, carinho e ajuda durante a minha estadia em Pira. Vocês se tornaram minha família por um período e, agora, meus amigos por um tempo! Obrigada por tudo!

Ao Dr. Ubiraem Mario Schalch, que me recebeu em Pira com todo boa vontade, tendo sido essencial para encontrar a fazenda ideal para realização das coletas, além de ter dado toda ajuda e apoio durante minha permanência em Pira.

Aos funcionários do Hovet do campus de Pirassununga que muito me ajudaram durante a minha permanência por lá;

À Suzana Lima, veterinária da fazenda onde foi realizado o experimento. Muito obrigada por ter disponibilizado os animais utilizados ao longo do experimento. Sua confiança, paciência e ajuda foram importantíssimos para conclusão do estudo.

Aos funcionários da fazenda, nos quais eu convivi diariamente por 6 meses, por toda dedicação, paciência e ajuda. Mesmo atrapalhando e atrasando a ordenha e dificultando o trabalho, sempre me ajudaram e me trataram com todo respeito. Vocês foram ótimos!

A Leonilda Ester Reinert Raspantini e ao PC imensa ajuda no processamento das amostras em Pirassununga. Obrigada pelo carinho e amizade durante todo o período que eu fiquei lá;

À Elaine do CEPTOX, que também me ajudou no processamento das amostra durante todo período experimental!

À Profa. Dra. Silvana Gorniák, que permitiu o processamento das amostras no CEPTOX durante o experimento.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo: Archivaldo Reche Junior, Carla Bargi Belli, Carlos Eduardo Larsson, Denise Saretta Schwartz, Enrico Lippi Ortolani, Fábio Celidônio Pogliani, Fernando José Benesi, Lilian Gregory, Marcia Mery Kogika, Maria Helena Matiko Akao Larsson, Maria Claudia Araripe Sucupira, Mitika Kurubayashi Hagiwara, Raquel Yvonne Arantes Bacarin, Silvia Regina Ricci Lucas, Viviani Gomes e Wilson Roberto Fernandes. Agradeço pelos ensinamentos e agradável convivência ao longo deste período.

À Cláudia Regina Stricagnolo por toda paciência e ajuda durante o processamento dos microbiológicos, Mesmo com todas as suas broncas foi muito bom ter tido sua ajuda durante o experimento.

À equipe da pós-graduação Cláudia Lima, Daura Taciana Vaz Alves, Henrique Narducci de Olveira e Marli Costa Ribeiro,

Às funcionarias do VCM: Adelaide F.J. Borges, Carolina Aroma, Maria Aparecida de Freitas, e Silvana R. Guedes

Às funcionárias do laboratório: Clara S. Mori, Samantha Ive Myashiro, Carmen S. Ribeiro, Marly E F de Castro, Maria Helena da Silva Pelossari, Edina Santana dos Santos e Creide Donizete Costa por toda ajuda e paciência

Aos demais pós-graduandos do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela constante troca de conhecimento e agradável convivência

Aos funcionários da biblioteca "Virginie Buff D'Ápice". Sempre muito dispostos a ajudar.

À MSD, por ter acreditado no trabalho, disponilizando os medicamento usado e os discos de antibiograma.

Ao Prof. Dr. Magnus Ake Gidlund e ao Eduardo , do ICB que foram essenciais para o processamento das amostras de leite, disponibilizando a ultracentrifuga.

Enfim a todos e a tudo que de alguma forma possam ter colaborado e participado desta conquista, os meus mais sinceros agradecimentos de todo o coração!!!

"Depois de escalar uma montanha muito alta, descobrimos que há muitas outras montanhas por escalar."

Nelson Mandela

RESUMO

BARBOSA LIMA, M. G. **Perfil das citocinas no prognóstico da mamite bovina após antibioticoterapia.** [Profile of cytokines in bovine mastitis prognosis after antibiotic therapy]. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O presente estudo objetivou-se avaliar o perfil das citocinas como indicador prognóstico em diferentes protocolos de tratamento da mamite bovina. De um total de 130 vacas em lactação da raça holandesa foram selecionadas cinco vacas sem alteração ao exame do leite (C-), cinco vacas sem grumos no leite, mas com CMT positivo e 30 vacas com mamite clínica. Os animais com mamite clínica foram alocados em três grupos. O grupo G1 (n=10) recebeu tratamento com antibiótico sistêmico (enrofloxacina), enquanto o grupo G2 (n=10) recebeu somente antibiótico intramamário (sulfato de cefquinoma) e o grupo G3 (n=10) foi tratado com os dois princípios (enrofloxacina sistêmico e sulfato de cefquinoma intramamário). Os grupos controle foram formados respectivamente por animais negativos para as duas provas (C1; n=5), e negativos para a prova de fundo escuro e positivos para CMT (C2; n=5). Amostras de leite e sangue foram colhidas antes do tratamento (M0) e no segundo (M1), quinto (M2) e décimo segundo dia (M3) após o término do tratamento para serem submetidas a exame bacteriológico do leite, antibiograma do leite, dosagem de citocinas no leite e no sangue (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α INF-γ) e dosagem de imunoglobulinas no leite e no sangue (IgG1, IgG2, IgM e IgA). Foi verificada a normalidade da distribuição dos resultados, utilizando-se teste de Anderson-Darling. Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, foram realizados os testes de análise de variância *ANOVA One-way (Unstacked)* (para dados com distribuição normal) e *Mann-Whitney* (para dados que não apresentaram distribuição normal), sendo as análises consideradas significativas as que apresentaram P≤0,05. Todos os animais do G3 apresentaram cura clínica e 80% cura bacteriológica nos momentos subsequentes ao tratamento (M1a M3). Ao se avaliar a resposta imunológica desse grupo, notou-se primeiramente o aumento de IL-6 sérico no M1 acompanhado de IgG1 e IgG2, os quais juntamente com o aumento de IL-4 e TNF-α perpetuaram a inflamação até o M2, enquanto que na glândula mamária já se iniciava a resolução da inflamação

com o aumento de IL-10. Por outro lado, os animais do grupo G2 apresentaram cura clínica e bacteriológica no M1, porém esta não se manteve. Imunologicamente, após o tratamento, o perfil predominante desse grupo foi o Th2 com aumento de IgG1 e IL-4. Ao final do experimento, alguns animais do grupo G2 voltaram a manifestar a doença clinicamente, e tal fato foi acompanhado da diminuição das concentrações de IL-4, IgG1 e de IL-6 no leite. Nos animais do grupo G1 houve cura clínica não absoluta e 40% de cura bacteriológica no M3. Imunologicamente, observou-se altos níveis de IL-6 e IL-8 no leite durante todo o período de tratamento e diminuição de IgG2 sérico no M3 correlacionado negativamente com a IgG2 láctea, caracterizando uma resposta local tardia. Os resultados permitem inferir que o acompanhamento por mais de duas semanas da dinâmica da resposta imunológica depende da eficiência do protocolo antimicrobiana para se estabelecer um prognóstico. Além disso, a definição precoce da resposta imune pode ser dificultada pelo mais intenso tratamento antimicrobiano observado nos animais do tratamento combinado (G3) sendo insuficiente para debelar precocemente a infecção quando usado um tratamento antimicrobiano ineficiente.

Palavras-Chaves: Resposta imune. Mamite. Prognóstico. Tratamento. Vacas leiteiras.

ABSTRACT

BARBOSA LIMA, M. G. **Profile of cytokines in bovine mastitis prognosis after antibiotic therapy [**Perfil das citocinas no prognóstico da mamite bovina após antibioticoterapia]. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The present study aimed to evaluate the cytokine profile as a prognostic in different treatment of bovine mastitis indicator. A total of 130 lactating cows of Holstein cows five without change to the examination of milk (C -), five cows in milk without lumps , but with positive CMT and 30 cows with clinical mastitis were selected . Animals with clinical mastitis were divided into three groups. The G1 (n = 10) received treatment with systemic antibiotics (enrofloxacin), while the G2 (n = 10) received only antibiotic intramammary (Cefquinome sulfate) and G3 (n = 10) group was treated with the two principles (systemic enrofloxacin and intramammary cefquinome sulfate). Control groups were formed respectively by the two negative tests (C1, n = 5) animals, and negative for evidence of dark and positive background for CMT (C2, n = 5). Milk and blood samples were collected before treatment (M0) and second (M1) , fifth (M2) and the twelfth day (M3) after completion of treatment to undergo bacteriological examination of milk , milk antibiogram, dosage cytokines in milk and blood (IL-1 , IL-2 , IL-4 , IL-6 , IL-8 , IL-10 , TNF- α IFN- γ) and serum immunoglobulin in milk and blood (IgG1 , IgG2 , IgM and IgA) . Normal distribution of the results was verified using the Anderson- Darling test. For the evaluation of differences between the means of the results obtained , tests of ANOVA One -way (unstacked) (for data with normal distribution) and Mann - Whitney test (for data that were not normally distributed) were performed and the analyzes considered significant if $P \leq 0.05$ showed that . All G3 animals showed clinical cure and bacteriological cure in 80 % subsequent to treatment time (M1a M3). In evaluating the immune response of this group was noted primarily increased serum IL-6 in M1 together with IgG1 and IgG2, which together with the increased IL -4 and TNF- α to perpetuate inflammation M2 while mammary gland that has already started the resolution of inflammation with increased IL-10. On the other hand, the G2 group showed clinical and bacteriological cure in M1, but this was not maintained. Immunologically, after treatment, the predominant profile of this group was to increase the Th2 IgG1 and IL-4. At the end of the experiment, some animals from G2 again manifesting the disease clinically,

and this fact was accompanied by decreased concentrations of IL - 4 , IgG1 and IL - 6 in milk. In animals of G1 there was no absolute clinical cure and bacteriological cure 40 % of the M3. Immunologically , it was observed high levels of IL-6 and IL-8 in the milk during the treatment period and a decrease in serum IgG2 M3 negatively correlated with milk IgG2 , featuring a late local response . The results may imply that monitoring for more than two weeks of the dynamics of the immune response depends on the efficiency of the antimicrobial protocol to establish a prognosis. In addition, the early definition of the immune response may be complicated by better antimicrobial treatment of animals observed in combined treatment (G3) being insufficient to overcome the infection early inefficient when used antimicrobials.

Key Words: Immune Response. Mastitis. Prognosis. Treatment. Dairy cows.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número e porcentagem da frequência dos resultados negativos ao teste da caneca de fundo escuro nos momentos experimentais de cada tratamento – São Paulo – 2013.....	40
Tabela 2 -	Médias e desvio padrão das análises com o contador de células somáticas portátil das amostras dos grupos experimentais e controles - São Paulo – 2013.....	44
Tabela 3 -	Médias e desvio padrão das análises com o contador de células somáticas portátil em relação aos momentos experimentais - São Paulo – 2013.....	44
Tabela 4 -	Médias e desvio padrão dos valores de CCS das amostras das amostras dos grupos experimentais e controles enviados para análise na Clínica do Leite - São Paulo – 2013.....	45
Tabela 5 -	Médias e desvio padrão dos valores de CCS das amostras das amostras em relação aos momentos experimentais - São Paulo – 2013.....	46
Tabela 6 -	Classificação do número e a porcentagem de animais negativos no exame bacteriológico - São Paulo – 2013.....	47
Tabela 7 -	Médias e desvio padrão da concentração de IgG_1 no soro lácteos dos animais submetidos a tratamento e dos grupos controle – São Paulo – 2013.....	50
Tabela 8 -	Resultados da média e desvio padrão da concentração de IgG1 no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	52
Tabela 9 -	Médias e desvio padrão da concentração de IgG_2 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	52
Tabela 10 -	Médias e desvio padrão da concentração de IgG2 no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	53
Tabela 11 -	Médias e desvio padrão da concentração de IgM no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	54

Tabela 12 -	Médias e desvio padrão da concentração de IgM no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	55
Tabela 13 -	Médias e desvio padrão da concentração de IgA no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	56
Tabela 14 -	Médias e desvio padrão da concentração de IgA no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	57
Tabela 15 -	Médias e desvio padrão da concentração de IL-2 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	58
Tabela 16 -	Médias e desvio padrão da concentração de IL-2 no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	59
Tabela 17 -	Médias e desvio padrão da concentração de IL-4 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	60
Tabela 18 -	Médias e desvio padrão da concentração de IL-4 no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	61
Tabela 19 -	Médias e desvio padrão da concentração de IL-6 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	62
Tabela 20 -	Médias e desvio padrão da concentração de IL-6 no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	63
Tabela 21 -	Médias e desvio padrão da concentração de IL-8 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	64
Tabela 22 -	Médias e desvio padrão dos níveis de IL-8 no soro sanguíneo das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	65
Tabela 23 -	Médias e desvio padrão da concentração de IL-10 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	66

Tabela 24 -	Médias e desvio padrão dos níveis de IL-10 no soro sanguíneo das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	67
Tabela 25 -	Médias e desvio padrão da concentração de IFN - γ no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	68
Tabela 26 -	Médias e desvio padrão dos níveis de IFN - γ no soro sanguíneo das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	68
Tabela 27 -	Resultados da média e desvio padrão da concentração de TNF-α no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	69
Tabela 28 -	Resultados da média e desvio padrão dos níveis de TNF-α no soro sanguíneo das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	70
Tabela 29 -	Índices de correlação séricas e lácteas para as variáveis subclasses de imunoglobulinas e citocinas das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013.....	71

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico - 1	Frequência dos escores de CMT para cada momento experimental no grupo de tratamento combinado (G1) – São Paulo – 2013.....	41
Gráfico - 2	Frequência dos escores de CMT para cada momento experimental no grupo de tratamento intramamário (G2) – São Paulo – 2013.....	42
Gráfico - 3	Frequência dos escores de CMT para cada momento experimental no grupo de tratamento sistêmico (G3) – São Paulo – 2013.....	43
Gráfico - 4	Média das CCS dos grupos experimentais ao longo do tratamento e dos grupos controle – São Paulo – 2013.....	46
Gráfico - 5	Incidência de patógenos encontrados nos grupos experimentais – São Paulo – 2013.....	48
Figura - 1	Representação esquemática das etapas de triagem e formação de grupos experimentais – São Paulo – 2013.....	32
Quadro - 1	Critérios de inclusão para composição dos grupos experimentais – São Paulo – 2013.....	30

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ºC	Grau *Celsius*
µg	microgramas
µL	Microlitro
ANOVA	One-way Analysis of Variance
CMT	*Califórnia Mastitis Test*
CCS	Contagem de células somáticas
EDTA	Ácidoetilenodiamino Tetracético
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
ESALQ	Escola superior de agronomia Luiz de Queiróz
FE	Teste de fundo escuro
IFN-γ	Interferon - gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2	Imunoglobulina G2
IgM	Imunoglobulina M
IL -4	Interleucina – 4
IL-10	Interleucina – 10
IL-2	Interleucina -2
IL-6	Interleucina – 6
IL-8	Interleucina – 8

LOG	Logaritmo
Mg	miligramas
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/Kg	Miligramas por kilo
mL	Mililitros
N	Número de animais
pg/mL	Picogramas por mililitros
Rpm	Rotação por minuto
SA – PE	Estreptavidina-ficoeritrina
TNF-α	Fator de necrose tumoral - alpha
UI	Unidade internacional
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Departamento de clínica Médica

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO.....**	24
2	**OBJETIVO.....**	28
3	**MATERIAL E MÉTODOS.....**	29
3.1	ANIMAIS UTILIZADOS E DELINEAMETO EXPERIMENTAL.....	29
3.1.1	**Grupo controle.....**	30
3.1.2	**Grupo tratamento.....**	30
3.2	PRIMEIRA FASE.....	33
3.2.1	**Triagem dos animais.....**	33
3.2.2	**Coleta das amostras.....**	33
3.2.2.1	Coleta do leite.....	33
3.2.2.2	Coleta de sangue.....	34
3.3	SEGUNDA FASE.....	35
3.3.1	**Exame Bacteriológico.....**	35
3.3.2	**Antibiograma.....**	36
3.3.3	**Quantificação das imunoglobulinas no leite.....**	36
3.3.4	**Quantificação das citocinas séricas.....**	37
3.3.5	**Quantificação das imunoglobulinas séricas.....**	38
3.3.6	**Quantificação das citocinas séricas.....**	38
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4	**RESULTADOS.....**	40
4.1	DIAGNÓSTICO DA MAMITE.....	40
4.2	RESPOSTA IMUNE.....	49

4.2.1	**IgG1**.....	49
4.2.2	**IgG2**.....	51
4.2.3	**IgM**.....	53
4.2.4	**IgA**.....	55
4.2.5	**IL-2**.....	57
4.2.6	**IL-4**.....	59
4.2.7	**IL-6**.....	61
4.2.8	**IL-8**.....	63
4.2.9	**IL-10**.....	65
4.2.10	**IFN-γ**.....	67
4.2.11	**TNF-α**.....	69
4.2.12	**Correlação**.....	70
5	**DISCUSSÃO**.....	72
6	**CONCLUSAO**.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A mamite é a inflamação do parênquima da glândula mamária causada principalmente por bactérias. É caracterizada por modificações patológicas no tecido glandular e alterações fisico-químicas no leite que determinam prejuízos qualitativos e quantitativos a produção de leite (MEHRZAD et al., 2009). No Brasil, devido à alta prevalência da mamite nos rebanhos, ocorre uma perda de 12 a 15 % da produção, totalizando cerca de 2,8 bilhões de litros/ano em relação à produção anual de 20 bilhões de litros (REIS et al., 2003).

Existem muitos estudos sobre diagnóstico e etiologia e é indiscutível que todas as condutas adotadas para monitorar seu diagnóstico e controle devam ser criteriosamente consideradas para garantir a viabilidade econômica dos animais em questão. Apesar desses esforços, as variações nas respostas ao tratamento e a necessidade de dominar as possibilidades de prognóstico ainda representam um grande desafio.

Os patógenos envolvidos na mamite possuem diversos fatores de virulência que auxiliam na colonização e infecção da glândula mamária. São capazes de se aderir às células epiteliais, produzirem cápsulas que dificultam a destruição pelos neutrófilos, por meio de endotoxinas e exotoxinas que inativam leucócitos, alguns podem se manter no interior das células para escapar da resposta imune, resultando em animais refratários a doença (SORDILLO ; STREICHER, 2002).

Os mecanismos de defesa da glândula mamária podem ser classificados em imunidade inata e imunidade específica. A imunidade inata ou inespecífica é a defesa que predomina nos estágios iniciais da lactação e é composta por barreiras anatômicas, solúveis e celulares (SORDILLO, 2005; RAINARD ; RIOLLET, 2006). A imunidade específica ou adquirida reconhece patógenos específicos e é mediada por moléculas de anticorpos, macrófagos e linfócitos (SORDILLO, 2005).

A resposta imune que a glândula mamária recorre frente a uma infecção, inicia-se por macrófagos residentes, responsáveis por identificar os agentes invasores e promover a liberação de citocinas, aumentando a permeabilidade local e, consequente, migração de macrófagos inflamatórios e neutrófilos. As subpopulações de linfócitos T auxiliares (CD-4) arquitetam uma resposta imune padrão Th1 ou Th2 através de liberação de citocinas. Se a resposta for padrão Th1,

há estímulo da proliferação de células B secretoras de IgG2. Se a resposta for padrão Th2, ocorrerá estímulo da proliferação de células B secretoras de IgG1, principalmente (WORKU et al., 1994). Essas imunoglobulinas agem auxiliando a fagocitose de patógenos por neutrófilos, sendo a IgG1 responsável principalmente por diminuir a colonização bacteriana, neutralizar toxinas e a IgG2 por atuar com a principal opsonina para fagocitose por neutrófilos (BROWN et al., 1998; ESTES et al., 1998). A ativação ou inibição de um padrão de resposta e sua intensidade é dependente de diferentes citocinas liberadas, que são produzidas e secretadas por células que podem ou não pertencer ao sistema imune (TIZARD, 2009). As principais citocinas produzidas por células epiteliais e neutrófilos são as Interleucinas, Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α) e Interferon-gama (IFN-γ) considerados como marcadores de defesa da glândula mamária. Elas desencadeiam o processo inflamatório por alteração na permeabilidade vascular, promovem o recrutamento de leucócitos, estimulam as células endoteliais locais a expressarem adesinas aos neutrófilos, induzindo-os a se infiltrar no tecido mamário que poderão ser responsáveis pelo sucesso do controle da infecção (BANNERMAN et al., 2004; SORDILLO, 2005).

As células Th1 facilitam a resposta imune celular ou citotóxica pela produção de citocinas IL-2, INF-γ e TNF-α, enquanto as células Th2 secretam principalmente IL-4, IL-5 e IL-10, que auxiliam os linfócitos B a produzirem anticorpos, facilitando a resposta imune humoral (MITELMAN; BUCCHERI et al., 2009). Pode-se dizer ainda que as citocinas com padrão Th1 são aquelas responsáveis por processos pró-inflamatórios enquanto que as citocinas com padrão Th2 são as responsáveis pelos processos antiinflamatórios (PAUL; SEDER, 1994; BROWN et al., 1998).

O TNF-α predomina na fase aguda da infecção. Modula reações como fagocitose ou recrutamento de leucócitos, devido a sua atividade quimiotática e à elevada expressão de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes e nas células endoteliais (RAINARD; POUTREL, 2000; PAAPE et al. 2000). A IL-6 facilita a troca de neutrófilos por monócitos visando diminuir os efeitos deletérios dos neutrófilos na glândula mamária. Essa citocina está envolvida no choque séptico durante a mamite aguda ou hiperaguda causada por coliformes e S. aureus (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

A IL-8 é mais produzida na mamite por E. coli, mas pouco presente em mamites por S. aureus (HARADA et al., 1994). A IL-12 tem o papel de mediadora entre as imunidades inata e adaptativa (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

Muitos estudos têm sido feitos com a finalidade de investigar as variações dos níveis das citocinas frente ao processo infeccioso da glândula mamária, porém nenhum destes estudos concluiu a função exata destas durante a mamite (PYÖRÄLÄ, 2003; BANNERMAN et al., 2004; ALLUWAIMI, 2004; SORDILLO, 2005; RAINARD; RIOLLET, 2006). Vacas infectadas com S. aureus e E. coli tiveram os níveis aumentados no leite de IL-1, IFN-γ e IL-12, aumento de IL-10 em diferentes momentos da infecção e aumento de IL-8 e TNF-α apenas em animais infectados com E. coli (BANNERMAN et al., 2004). Lee et al. (2003), observaram uma diminuição da quantidade de IL-8 e TNF-α no leite de vacas contaminadas por E. coli. IL-2 e IFN-γ foram as principais citocinas produzidas durante a resposta à mamite (SORDILLO, 2005) e IL-6 e TNF-α em indução de mamite por E. coli (RAINARD; RIOLLET, 2006).

A antibioticoterapia exerce um importante papel no tratamento da mamite, tendo como principal objetivo eliminar a infecção intramamária e reduzir as fontes de infecção (ERSKINE et al., 1993). Uma grande variedade de antimicrobianos tem sido utilizada, muitas vezes de forma inadequada e indiscriminada, prejudicando a solução do problema devido ao baixo grau de ionização no leite com pH alterado, baixa sensibilidade do microrganismo frente ao medicamento e, principalmente, pela grande ocorrência de resistência microbiana à droga (COSTA et al., 2000; SAKWINSKA et al., 2011; SAINI et al., 2011).

Existem vários protocolos para o tratamento da mamite infecciosa dos bovinos e a escolha deste muitas vezes diverge das adotadas para as demais doenças infecciosas por comprometer diretamente a produção dos animais e desta forma, o tratamento se torna dependente da relação custo benefício (ZAFALON; FILHO, 2006). Dentre os medicamentos indicados no tratamento de mamite bovina, estão a enrofloxacina e a cefquinoma, que possuem alta eficácia no combate aos agentes causadores da mamite (LANGONI et al., 2000; REIS et al., 2003; KASRAVI et al., 2011).

A enrofloxacina é um quimioterápico antibacteriano, derivado do ácido quinoloncarboxílico. É uma fluorquinolona que bloqueia a girase bacteriana, enzima de replicação do DNA, inibindo totalmente o metabolismo e a multiplicação do

microrganismo (LEVISON; JAWETZ, 1998). Cefquinoma é uma cefalosporina de quarta geração, que possui um amplo espectro, é distribuída rapidamente em animais tratados, atingindo uma rápida ação antibacteriana. Possui grande atividade contra Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus spp e é utilizado em vacas lactantes, por via intramamária no tratamento de mamites causadas por bactérias gram-negativas (LIMBERT et al., 1991).

Considerando que a proposta do presente estudo não é identificar o tratamento mais eficiente e sim o potencial prognóstico imune do organismo, podendo resultar no sucesso ou no fracasso da cura clínica, o presente estudo objetiva avalias o perfil das citocinas no leite está relacionado à evolução da doença, proporcionalmente quanto à resposta ao tratamento e ao prognóstico, na primeira quinzena de tratamento.

2 OBJETIVO

Avaliar o perfil das citocinas como indicador prognóstico em diferentes protocolos de tratamento de mamite bovina.

Avaliar a dinâmica das citocinas durante e após o tratamento da mamite

Comparar os tratamentos quanto à cura clínica e microbiológica e quais citocinas podem ser associadas aos respectivos perfis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo desenvolvido foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no dia 21 de Setembro de 2011, protocolado sob o número 2435/2011.

O estudo foi dividido em duas fases. Na primeira fase, após a seleção da propriedade, realizou-se a triagem dos animais para a composição dos grupos e coleta das amostras e a segunda fase foi destinada às análises laboratoriais das amostras coletadas realizadas no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.1 ANIMAIS UTILIZADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram incluídas no experimento 130 vacas da raça Holandesa, provenientes de um sistema de produção intensivo, com duas ordenhas diárias, localizado no município de Tambaú – SP. Os animais em lactação são confinados em galpões cobertos, separados em lotes de acordo com a produção e dias de lactação.

Estes animais foram avaliados quanto à presença da mamite e divididos em cinco grupos experimentais. Dois grupos considerados controle (C+ e C-) e três grupos considerados pelo tratamento (G1, G2 e G3), independente do patógeno isolado. Conforme critérios apresentadas no quadro 1,

Quadro 1 – Critérios de inclusão para composição dos grupos experimentais – São Paulo – 2013

	Grupo	Animais (n)	Fundo Escuro	CMT	Classificação	Tratamento
Controle	C-	5	Negativo	Negativo	Sadios	Nenhum
	C+	5	Negativo	Positivo	Mamite inaparente ou subclínica	Nenhum
Tratamento	G1	10	Positivo	Positivo	Mamite	Combinado (Intramamário e sistêmico)
	G2	10	Positivo	Positivo	Mamite	Intramamário
	G3	10	Positivo	Positivo	Mamite	Sistêmico

3.1.1 Grupo controle

Os animais pertencentes aos grupos controle não receberam nenhum tipo de tratamento durante o experimento e, para garantir a negatividade ou inaparência da mamite, além das análises consideraras critério de inclusão amostral, foram colhidas amostras de leite pareadas, com intervalo de sete dias, para realização do exame microbiológico.

3.1.2 Grupo tratamento

Após a identificação e a triagem, os animais considerados positivos para mamite foram divididos aleatoriamente em três subgrupos e, cada grupo submetido a um protocolo de tratamento. Os tratamentos (G1, G2 e G3) estão subsequentemente discriminado:

G1 – Tratamento combinado: foram selecionados dez animais positivos para mamite, submetidos ao protocolo de tratamento combinado com infusão

intramamária de 8,5 mg de Sulfato de Cefquinoma[1] após cada ordenha, totalizando 3 aplicações e administração intramuscular de 2,5 mg/kg de Enrofloxacina[2] por 3 dias (SHPIGEL et al., 1997).

G2 – Tratamento Intramamário: foram utilizadas dez vacas com mamite, que receberam com infusão intramamária de 8,5 mg de Sulfato de Cefquinoma[2], após cada ordenha, totalizando três aplicações (SWINKELS et al., 2013).

G3 – Tratamento sistêmico: após triagem, outras vacas consideradas positivas para mamite por meio das provas, foram submetidas ao protocolo de tratamento no qual recebiam 2,5 mg/kg de Enrofloxacina[3], por via intramuscular, durante três dias (HOEBEN et al., 2000).

Antes do tratamento, os animais foram submetidos ao exame físico da glândula mamária e foi realizada coletas de amostras de leite e sangue para posterior realização de análises laboratoriais (Momento 0). Os exames físicos e coletas de amostras foram repetidos ao segundo (Momento 1), quinto (Momento 2) e décimo segundo (Momento 3) dia após o término do tratamento (SHPIGEL et al., 1997).

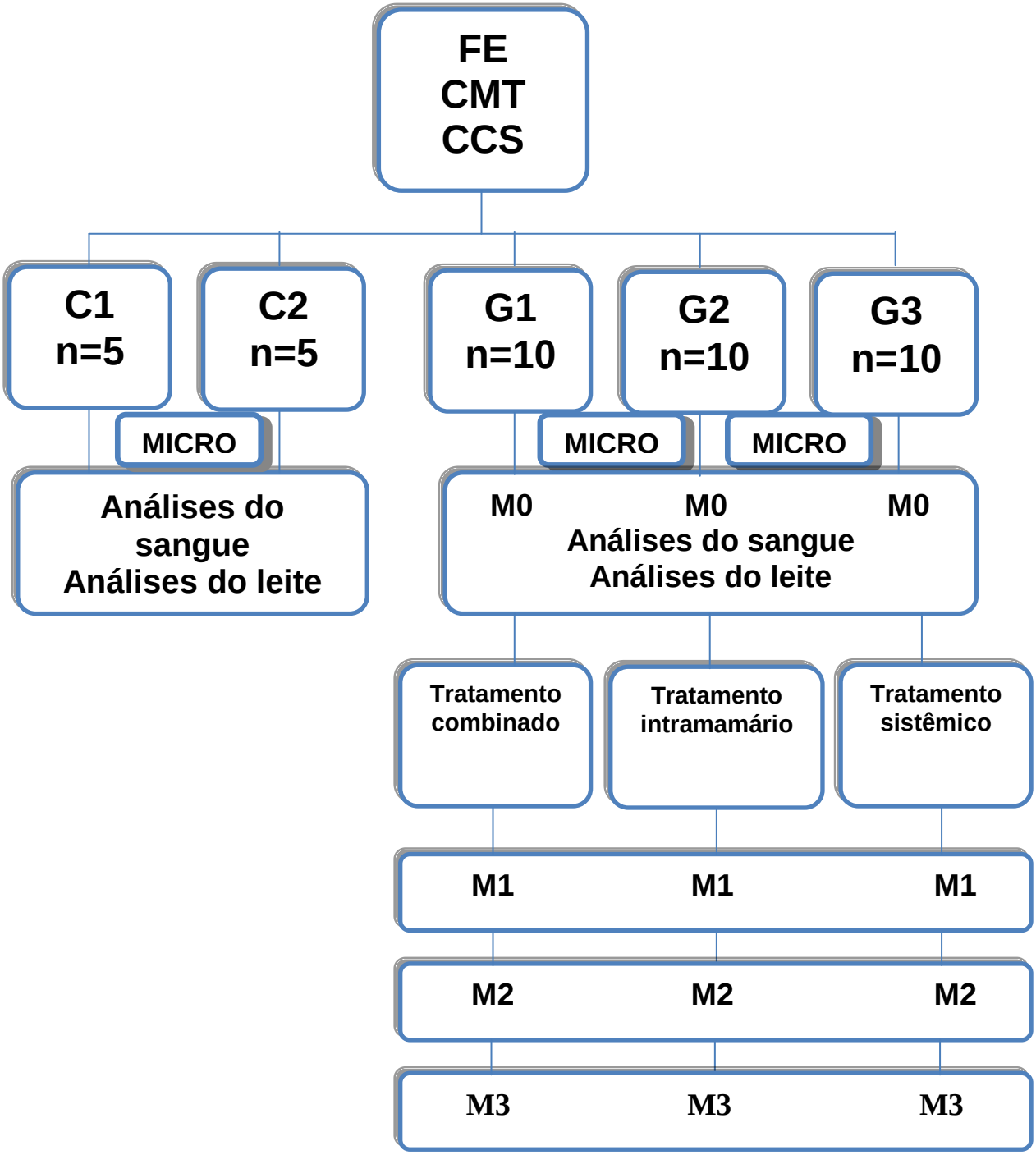
O delineamento experimental foi realizado conforme ilustra a figura.

---

[1] Cobactan® VL – Intervet; MSD Saúde Animal.

[2] Flotril®10% - Schering-Ploug; MSD Saúde Animal

Figura 1 – Representação esquemática das etapas de triagem e formação de grupos experimentais – São Paulo – 2013



3.2 PRIMEIRA FASE

A primeira fase foi destinada à triagem dos animais, coleta de amostras e tratamento dos animais considerados positivos para mamite no momento da triagem.

3.2.1 Triagem dos animais

A avaliação clínica das vacas lactantes foi feita por meio do exame físico da glândula mamária e do exame do leite (BIRGEL, 2008). Todos os quartos mamários foram avaliados por inspeção e palpação, observando o parênquima, teto e estruturas internas.

O teste da caneca de fundo escuro foi realizado em todos os animais da linha de ordenha, observando presença de alteração evidente nos primeiros jatos de leite.

Foi realizado o *Califórnia Mastitis Test* (CMT) utilizando detergente comercial específico[3], segundo Schalm e Noorlander (1957).

3.2.2 Coleta das amostras

Atendidos os critérios de inclusão amostral, foram coletadas amostras de leite e sangue, nos quatro momentos experimentais propostos.

3.2.2.1 Coleta de leite

As amostras de leite foram coletadas em quatro alíquotas. A primeira alíquota foi destinada à contagem de células somáticas (CCS) e composição do leite, enviada

[3] Reativo específico, marca: Fatec®

para análise no Laboratório Clínica do Leite, no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), Piracicaba – SP. A segunda alíquota foi coletada em dois frascos de 50 mL do tipo Falcon, mantidas refrigeradas até a chegada ao laboratório. No laboratório, as amostras foram centrifugadas a 1000 x *g* por 15 minutos a 4°C, de acordo com as recomendações de Koess; Hamann (2008). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, recuperando apenas o soro lácteo, dividido em três tubos do tipo Falcon de 15 mL e congelado em freezer -80°C, para posterior quantificação das citocinas e imunoglobulinas. A terceira alíquota foi coletada para realização do exame bacteriológico e antibiograma em frascos estéreis de acordo com o *National Mastitis Council* (HARMON et al., 1990). As amostras foram mantidas refrigeradas até a chegada ao laboratório e congeladas em freezer -20°C, para serem semeadas posteriormente. Finalmente, a quarta alíquota foi coletada em tubos tipo Falcon de 15 mL para contagem de células somáticas em contador portátil[4]. As amostras foram mantidas refrigeradas até a chegada ao laboratório e analisadas imediatamente. O contador portátil DCC Delaval® utiliza o método Fossomatic[5].

3.2.2.2 Coleta de sangue

Foram coletadas de cada animal, em todos os momentos, duas amostras de sangue, utilizando o sistema vácuo[6], por venopunção da veia superficial abdominal.

A primeira amostra foi coletada em um tubo siliconizado com EDTA[7] dipotássico, com capacidade de 4 mL, para realização do hemograma. O número total de leucócitos e de eritrócitos por microlitro foi mensurado em analisador automático de hematologia[8].

A outra alíquota de sangue foi coletada em dois tubos siliconizados, sem anticoagulante, com capacidade de 10 mL para obtenção do soro para dosagem de imunoglobulinas e quantificação das citocinas. Após a coleta, os tubos foram

[4] DCC: DeLaval® International AB, Tumba, Suécia
[5] FSCC; Fossomatic™ FC, Hillerød, Dinamarca
[6] Sistema Vacuntainer® - Becton Dickinson™, San Diego, CA.
[7] *Ethylenediamine tetraacetic acid* – ácidoetilenodiamino tetracético
[8] *BG2800Vet*® - Mindray

encaminhados ao laboratório em temperatura ambiente para retração do coágulo, onde foram centrifugados a 1.479 x *g* por 15 minutos. Após a centrifugação, o soro foi retirado com pipeta Pasteur e congelados a -80°C até o processamento.

3.3 SEGUNDA FASE

A segunda fase do experimento foi destinada ás análises laboratoriais das amostras coletadas durante o tratamento dos animais, e que foram processadas e congeladas para serem analisadas posteriormente, como a realização do exame bacteriológico, do antibiograma, a quantificação de citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α INF-γ) e de imunoglobulinas lácteas e séricas (IgG1, IgG2, IgM e IgA).

3.3.1 Exame bacteriológico do leite

O exame bacteriológico foi realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica (VCM) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

No laboratório, as amostras foram semeadas em placas de *Petri* contendo ágar-sangue de carneiro (ágar base[10] acrescido de 7% de sangue de carneiro), incubadas a 37°C e analisadas em 24, 48 e 72 horas (BAUER, 1966). Para as amostras com crescimento bacteriano, foi realizada a identificação presuntiva dos microrganismos por meio da morfologia da colônia e provas bioquímicas descritas por Lennette et al., (1985), seguida da classificação conforme critérios estabelecidos por KRIEG ; HOLT (1994), observando a morfologia das colônias, padrão de hemólise, pigmento e catalase e coagulase para identificação dos patógenos.

[10] Blood Agar base – Oxoide Hampshire – U.K

3.3.2 Antibiograma

O teste de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão por discos (Bauer et al. 1966).

Após a identificação dos patógenos no exame bacteriológico, as amostras positivas foram separadas e 3 a 5 colônias de cada amostra, com as mesmas características morfológicas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4 a 5 ml de caldo BHI[11] e incubadas a 37°C por 2 a 6 horas, para obter turbidez. Em seguida as amostras do caldo turvado foram semeadas com swab estéril sobre a superfície do meio de ágar[12]. A etapa seguinte consistiu na deposição dos discos, fazendo-se leve pressão para permitir o contato entre os mesmos e a superfície do meio inoculado. Utilizaram-se discos impregnados[13] com os seguintes antimicrobianos: Penicilina G (10 UI), Penicilina + Novobiocina (40µg), Tetraciclina (30µg), Gentamicina (10µg), Enrofloxacina (5µg), Ceftiofur (30µg), Eritromicina (15µg) e Cefquinoma[14] (30µg).

As placas foram incubadas em estufas a 37°C por 24 horas. A leitura foi realizada de acordo com o diâmetro de sensibilidade apresentado por cada amostra frente aos diversos antimicrobianos utilizados, classificando os micro-organismos como sensíveis, com sensibilidade intermediária ou resistentes (BAUER et al., 1966).

3.3.3 Quantificação das imunoglobulinas no leite

A quantificação das imunoglobulinas do leite foi realizada pelo método ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay),* com as amostras congeladas de soro lácteo. Foi utilizado kit comercial para cada imunoglobulina (IgG1[15], IgG2[16], IgA[17] e IgM[18]).

---

[11] BHI - Bacto™ Brain Heart Infusion, BD – France.
[12] Blood Agar base – Oxoide Hampshire – U.K
[13] Multifar, Sensifar-Vet - Cefar Diagnóstica®
[14] Cefquinome 30µg – Oxoide Hampshire – U.K.
[15] Bovine IgG1 ELISA Quantitation Set® – Bethyl Laboratories, Inc
[16] Bovine IgG2 ELISA Quantitation Set® – Bethyl Laboratories, Inc

As diluições variaram de acordo com as imunoglobulinas e as amostras dosadas: IgG1 foi diluída 1:50.000, IgG2 1:300.000, a diluição de IgA variou entre 1:500 e 1:4000 de acordo com a amostra analisada e IgM foi diluída 1:1000 (WILSON et al., 2007; PLOEGART et al., 2010).

A determinação da curva e a quantificação das amostras foram mensuradas em leitora[19] e analisadas pelo *Gen5 Data Analysis Software*. Após a determinação da curva os valores obtidos na leitura foram inseridos na fórmula dada pela curva obtendo-se dessa forma o valor das concentrações das imunoglobulinas

3.3.4 Quantificação das citocinas no leite

Para a quantificação das citocinas, o soro lácteo congelado foi novamente processado para retirada total da gordura e obtenção de um plasma límpido (BANNERMAN et al, 2004). As amostras foram descongeladas e centrifugadas em ultracentrífuga[20] a 44.000 x g a 4°C por 30 minutos, e o sobrenadante transparente foi recolhido e congelado em freezer - 80°C até o momento do processamento.

Para a dosagem das citocinas, o plasma claro ultra centrifugado foi usado sem diluição. O método utilizado foi o Bioplex *bead assay*[21], semelhante ao ELISA, no qual *beads* com marcadores biológicos reagem com a amostra contendo o biomarcador a ser dosado. Com a adição de um anticorpo de detecção, ocorre a formação de complexo. A detecção final é obtida com a adição de um conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (SA - PE), que funciona como um indicador de fluorescência, conforme as recomendações do fabricante.

A determinação da concentração foi realizada em leitora[22] que apresenta os dados baseado na intensidade da fluorescência em pg/mL. As citocinas quantificadas foram: IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFNγ e TNFα.

---

[17] Bovine IgA ELISA Quantitation Set® – Bethyl Laboratories, Inc
[18] Bovine IgM ELISA Quantitation Set® – Bethyl Laboratories, Inc
[19] Elx808 BioTek
[20] Himac CP 70 MX – Hitachi Koki Co., Tokio, JP
[21] Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canadá
[22] Bio - Plex® 200 Systens - Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canadá

3.3.5 Quantificação das imunoglobulinas séricas

A quantificação das imunoglobulinas séricas foi realizada nos quatro tempos de cada grupo dos animais submetidos a tratamento e nos animais pertencentes aos grupos controle do experimento. Foi empregado o método ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando kit comercial para cada imunoglobulina (IgG1[23], IgG2[24], IgA[25] e IgM[26]).

Utilizou-se aproximadamente 1µL de soro sanguíneo para realização das diluições, conforme as recomendações do fabricante, sendo 1:200.000 para IgG1 e IgG2, 1:1000 para IgA e 1:20.000 para IgM (WILSON et al., 2007; PLOEGART et al., 2010). A determinação da curva e das amostras foi realizada em leitora[27] e analisada pelo *Gen5 Data Analysis Software*. Após a determinação da curva os valores obtidos na leitura foram inseridos na fórmula dada pela curva obtendo-se dessa forma o valor das concentrações das imunoglobulinas.

3.3.6 Quantificação das citocinas séricas

A quantificação das citocinas no sangue foi realizada com o soro sanguíneo congelado a -80°C. As amostras foram utilizadas sem diluição e seguidas as recomendações do fabricante, conforme descrito anteriormente no item 3.3.4.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

[23] Bovine IgG1 ELISA Quantitation Set® – Bethyl Laboratories, Inc.
[24] Bovine IgG2 ELISA Quantitation Set® – Bethyl Laboratories, Inc.
[25] Bovine IgA ELISA kit – Abnova Corporation.
[26] Bovine IgM ELISA kit – Abnova Corporation.
[27] Elx808 BioTek.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* estatístico GraphPad InStat®, versão 3.01 para Windows 95[28].

Foi verificada a normalidade da distribuição dos resultados, utilizando-se teste de Anderson-Darling.

Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, foram realizados os testes de análise de variância *ANOVA One-way (Unstacked)* (para dados com distribuição normal) e *Mann-Whitney* (para dados que não apresentaram distribuição normal). Para todos os resultados, foram consideradas significativas as análises que apresentaram $P \leq 0,05$.

[28] GraphPad software, San Diego, California, USA.

4 RESULTADOS

Atendidos os critérios de inclusão e exclusão amostral, os animais alocados nos respectivos grupos foram submetidos aos diferentes protocolos de tratamento. As variáveis analisadas foram classificadas em:

5.1 Diagnóstico da mamite quanto ao aspecto inflamatório e/ou infeccioso;

5.2 Resposta imune.

4.1 DIAGNÓSTICO DA MAMITE

A primeira variável com finalidade diagnóstica foi a prova do fundo escuro do leite cujos resultados demonstraram uma diminuição gradativa da presença de grumos ao longo dos momentos experimentais nos animais tratados. Os animais do grupo combinado apresentaram predomínio (100 %) de amostra sem grumos no momento M1 até a última coleta, já nos grupos intramamário e sistêmico apresentaram uma amostra positiva (10%) no momento M3, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Número e porcentagem da frequência dos resultados negativos ao teste da caneca de fundo escuro nos momentos experimentais de cada tratamento – São Paulo – 2013

	G1 n (%) (-)	**G2 n (%) (-)**	**G3 n (%) (-)**
M0	0	0	0
M1	10 (100%)	6 (60%)	8 (80%)
M2	10 (100%)	10 (100%)	1 (10%)
M3	10 (100%)	9 (90%)	9 (90%)
P	<0,001	<0,001	<0,001

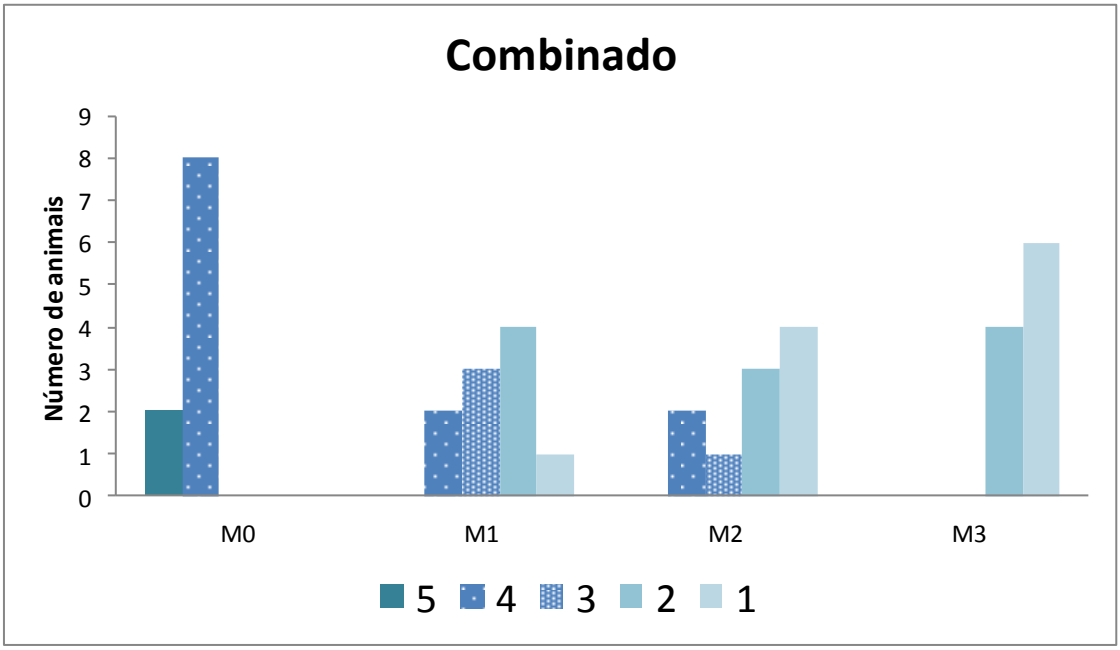
M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-; controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas.
(-): Negativo

Nos três grupos amostrais, as amostras de leite no momento M0 apresentaram diferença significativa para o teste de fundo escuro frente aos demais tempos (P<0,0001).

No exame de CMT, os animais dos grupos combinado e intramamário, apresentaram redução do escore de CMT (P<0,0001) nos momentos experimentais. O grupo submetido ao tratamento sistêmico diminuiu o escore de resultados até o momento M2, apresentando um aumento na mediana no momento M3 (P=0,0002).

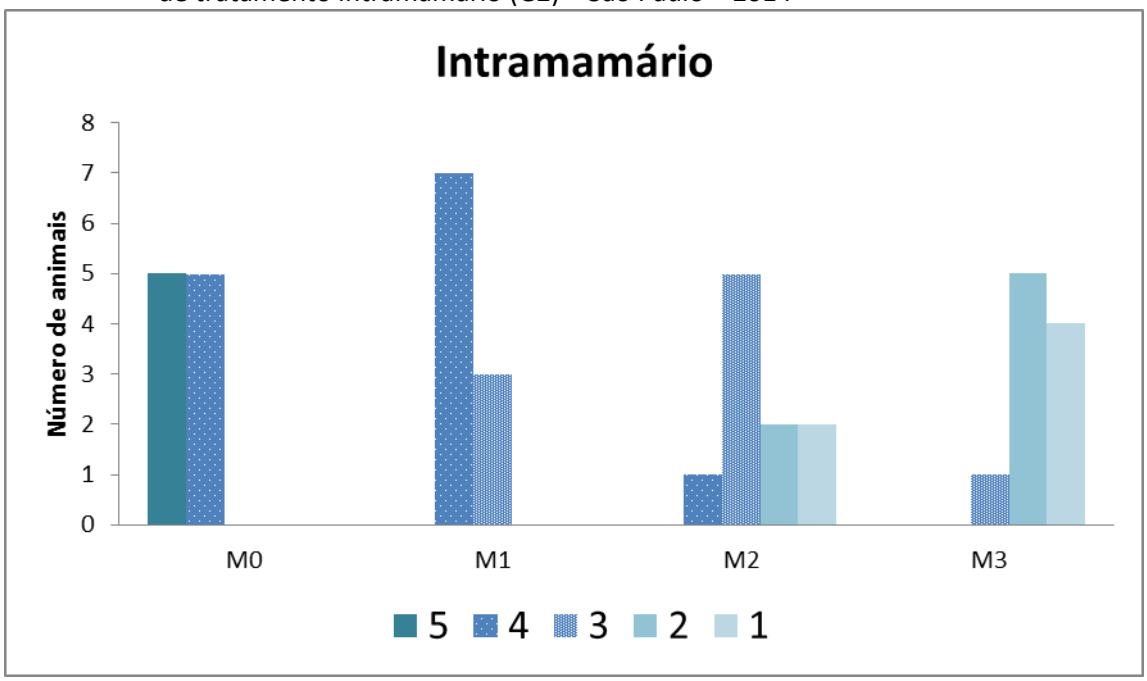
Os gráficos 1, 2 e 3 apresentam a frequência dos escores de CMT para cada momento experimental nos diferentes protocolos de tratamento.

Gráfico 1 - Frequência dos escores de CMT para cada momento experimental no grupo de tratamento combinado (G1) – São Paulo – 2013



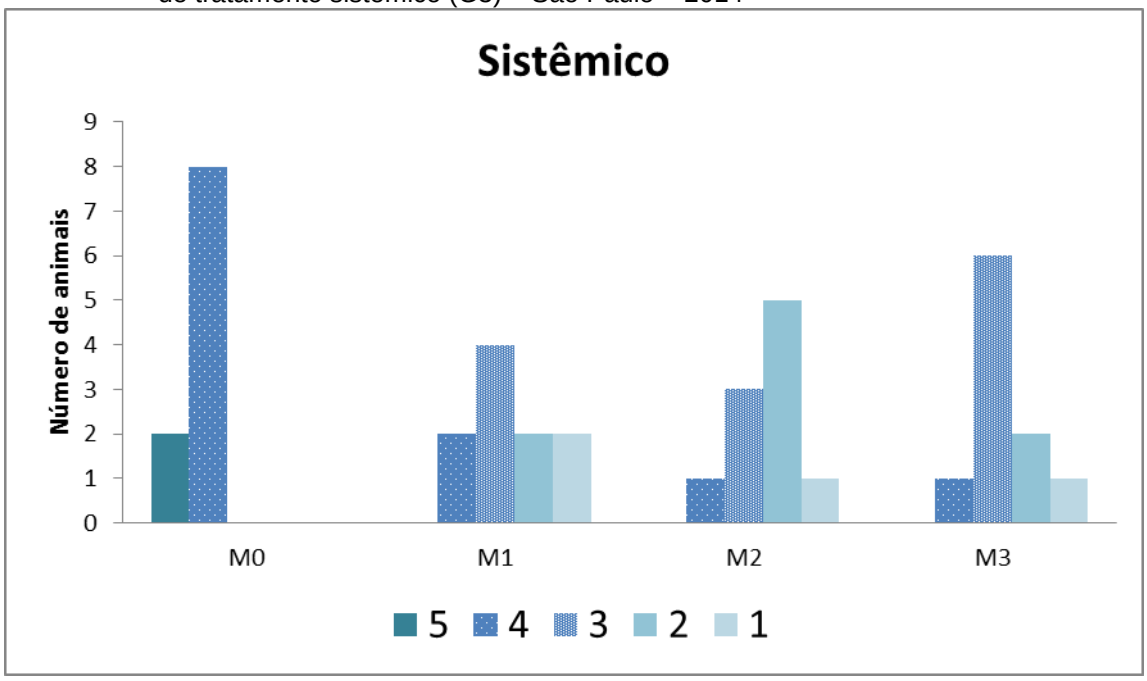
M0 - Momento 0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento.
Escore: 1: negativo, 2: fracamente positivo, 3: pouco positivo, 4: Positivo, 5: fortemente positivo.

Gráfico 2 - Frequência dos escores de CMT para cada momento experimental no grupo de tratamento intramamário (G2) – São Paulo – 2014



M0 - Momento 0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento.
Escore: 1: negativo, 2: fracamente positivo, 3: pouco positivo, 4: Positivo, 5: fortemente positivo.

Gráfico 3 - Frequência dos escores de CMT para cada momento experimental no grupo de tratamento sistêmico (G3) – São Paulo – 2014



M0: Momento 0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento.
Escore: 1: negativo, 2: fracamente positivo, 3: pouco positivo, 4: Positivo, 5: fortemente positivo.

Ao analisar a média da contagem de células somáticas por meio do contador portátil, pôde-se observar que os grupos combinado, intramamário e sistêmico apresentaram uma diminuição na celularidade das amostras do momento M0 ao momento M3 (P=0,0003, P<0,0001 e P<0,0001, respectivamente). As amostras de leite dos animais do grupo de tratamento intramamário e do tratamento sistêmico apresentaram diferença (P=0,0002 e P=0,0001) em relação às amostras dos grupos controles positivo e negativo nos momentos M0 e M1. No M2, as amostras de leite dos grupos intramamário e sistêmico apresentaram diferença entre as amostras do grupo controle negativo (P=0,0065). No M3, as amostras do grupo sistêmico apresentaram maior celularidade do que as amostras dos grupos combinado, intramamária e controle positivo e negativo (P=0,0002). Estes resultados estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Médias e desvio padrão das análises com o contador de células somáticas portátil das amostras dos grupos experimentais e controles - São Paulo – 2013

		M0	M1	M2	M3	C+	C-	P
G1	Média	3,25^{Aa}	2,82^{Aab}	2,47^{Aabc}	2,22^{Abc}	2,48^{ac}	1,68^{c}	0,0003
	D. padrão	± 0,19	± 0,57	±0,64	± 0,67	± 0,45	±0,65	
G2	Média	3,48^{Aa}	3,33^{Aa}	2,79^{Ab}	2,58^{ABb}	2,48^{b}	1,68^{c}	<0,0001
	D. padrão	± 0,19	± 0,19	± 0,25	± 0,54	± 0,45	±0,65	
G3	Média	3,44^{Aa}	2,67^{Ab}	2,92^{Aab}	3,15^{Bab}	2,48^{bc}	1,68^{c}	<0,0001
	D. padrão	±0,18	± 0,71	± 0,74	± 0,38	± 0,45	±0,65	

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-; controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

Tabela 3 – Médias e desvio padrão das análises com o contador de células somáticas portátil em relação aos momentos experimentais - São Paulo - 2014

		M0	M1	M2	M3
G1	Média	3,25^{ABCa}	2,82^{Aab}	2,47^{ABab}	2,22^{ACb}
	D. padrão	± 0,19	± 0,57	±0,64	± 0,67
G2	Média	3,48^{Aa}	3,33^{Aa}	3,33^{Ab}	2,58^{ABb}
	D. padrão	± 0,19	± 0,19	± 0,25	± 0,54
G3	Média	3,44^{ABa}	2,61^{Ab}	2,92^{Aab}	3,15^{Bab}
	D. padrão	±0,18	± 0,71	± 0,74	± 0,38
C+	Média	2,48^{BC}	2,48^{AB}	2,48^{AB}	2,48^{ABC}
	D. padrão	± 0,45	± 0,45	±0,45	± 0,45
C-	Média	1,68^{C}	1,68^{B}	1,68^{B}	1,68^{C}
	D. padrão	±0,65	± 0.65	± 0,65	± 0,65
P		0,0002	0,0001	0,0065	0,0002

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-; controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

Nas tabelas 4 e 5 demonstra-se que ao analisar a média da contagem de células somáticas, pôde-se observar que os três grupos submetidos aos protocolos de tratamento apresentaram diferença ao longo do tratamento quando comparados com os controles (P<0,0001, P<0,0001 e P=0,0311). No M0 e M1 os três protocolos de tratamento apresentaram celularidade maior do que os controles positivo e negativo (P<0,000 e P=0,0034). No M2 e M3, amostras do grupo controle negativo apresentaram menor celularidade do que as amostras dos grupos tratadas com medicamentos intramamário, sistêmico e grupo controle positivo (P=0,0066 e P=0,0131). O gráfico 4 apresenta a variação das médias de CCS nos grupos tratados ao longo do tratamento.

Tabela 4 – Médias e desvio padrão dos valores de CCS das amostras das amostras dos grupos experimentais e controles enviados para análise na Clínica do Leite - São Paulo - 2014

		M0	M1	M2	M3	C+	C-	P
G1	Média	$3,59^{Aa}$	$2,97^{Aab}$	$2,42^{Abc}$	$2,21^{Abc}$	$2,62^{b}$	$1,46^{c}$	<0,0001
	D. padrão	± 0,32	± 0,70	± 0,70	± 0,64	± 0,57	± 0,43	
G2	Média	$3,81^{Aa}$	$3,55^{Aab}$	$3,01^{ABbc}$	$2,59^{Ac}$	$2,62^{c}$	$1,46^{d}$	<0,0001
	D. padrão	± 0,17	± 0,32	± 0,61	± 0,63	± 0,57	± 0,43	
G3	Média	$3,53^{Aa}$	$3,51^{Aa}$	$3,47^{Ba}$	$2,74^{Aa}$	$2,62^{a}$	$1,46^{b}$	0,0311
	D. padrão	± 0,63	± 0,50	± 0,66	±0,82	± 0,57	± 0,43	

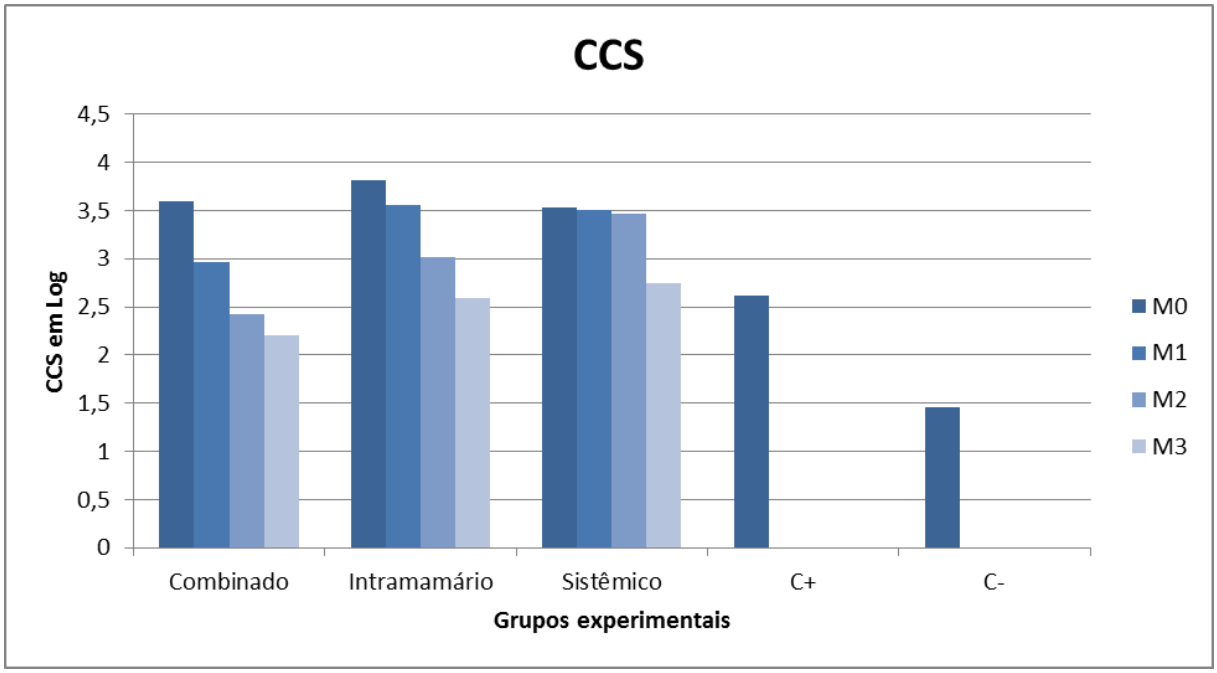
M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-; controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

Tabela 5 – Médias e desvio padrão dos valores de CCS das amostras das amostras em relação aos momentos experimentais - São Paulo - 2014

		M0	M1	M2	M3
G1	Média	3,59^{Aa}	2,97^{ABab}	2,42^{ACb}	2,21^{ABb}
	D. padrão	± 0,32	± 0,70	± 0,70	± 0,64
G2	Média	3,81^{Aa}	3.55^{Aab}	3,01^{ABbc}	2,59^{Ac}
	D. padrão	± 0,17	± 0,32	± 0,61	± 0,63
C3	Média	3,53^{Aa}	3,51^{Aa}	3,47^{Ba}	2,74^{Aa}
	D. padrão	± 0,63	± 0,50	± 0,66	±0,82
C+	Média	2,62^{B}	2,62^{B}	2,62^{AB}	2,62^{AB}
	D. padrão	± 0,57	± 0,57	± 0,57	± 0,57
C-	Média	1,46^{C}	1,46^{C}	1,46^{C}	1,46^{B}
	D. padrão	± 0,43	± 0,43	± 0,43	± 0,43
P		<0,0001	0,0034	0,0066	0,0131

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-; controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

Gráfico 4 – Média das CCS dos grupos experimentais ao longo do tratamento e dos grupos controle – São Paulo - 2014



As amostras de leite do grupo de tratamento combinado apresentou uma redução significativa do número de amostras com crescimento bacteriano no exame bacteriológico ao longo do tratamento (P=0,0013). No grupo intramamário não houve crescimento bacteriano nas amostras no M1, porém aumentou o número de amostras positivas nos momentos seguintes (P=0,2071). O grupo sistêmico não evidenciou o mesmo comportamento ao longo do tratamento, apresentando um aumento gradativo do número de amostras positivas (P=0,4414). Os patógenos isolados de cada grupo estão apresentados no gráfico 5.

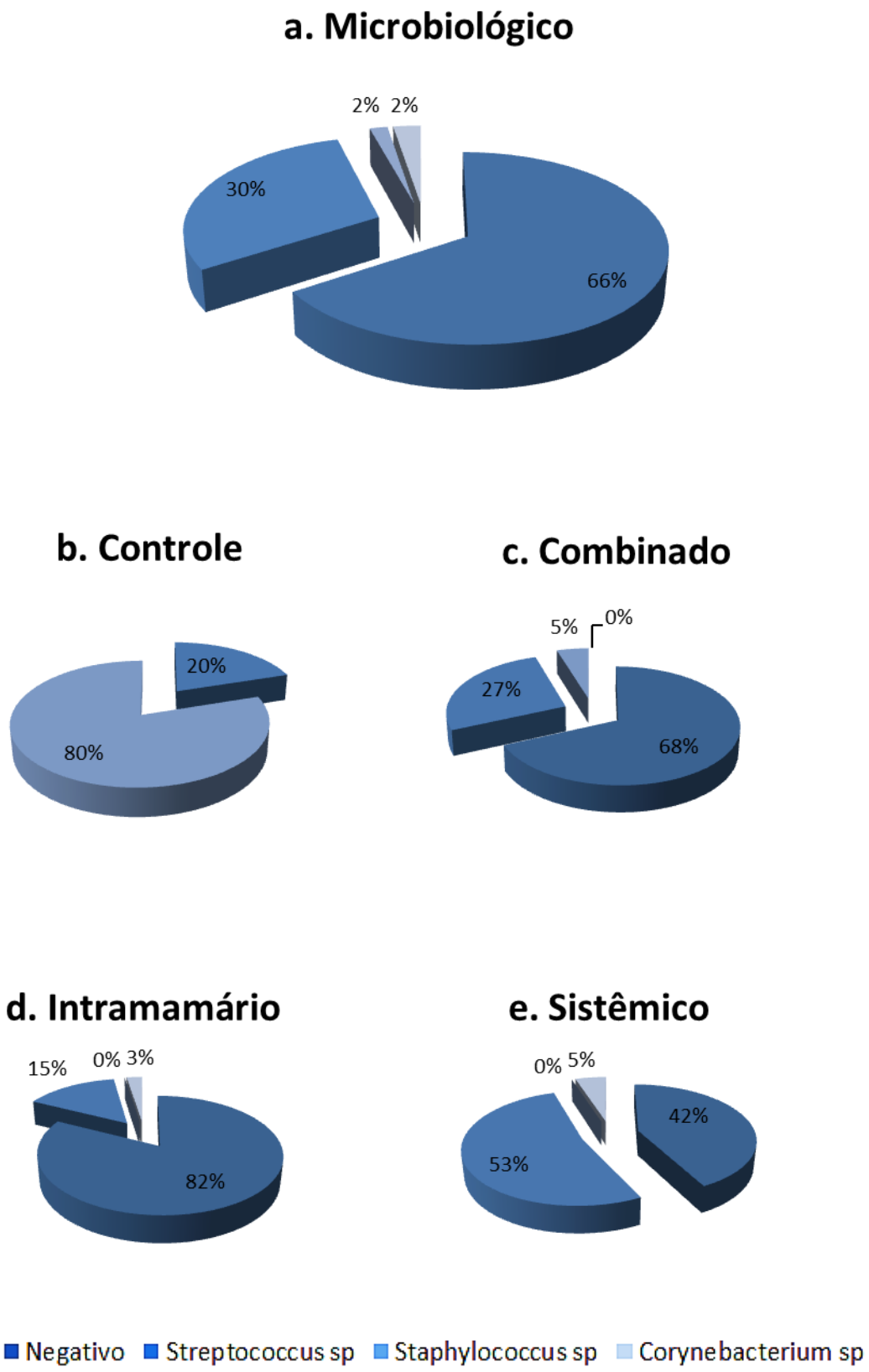
Na tabela 6 representa-se o número e a porcentagem de animais negativos encontrados no exame bacteriológico.

Tabela 6 – Classificação do número e a porcentagem de animais negativos no exame bacteriológico - São Paulo – 2014

	G1 n (%)	G2 n (%)	G3 n (%)
M0	2 (20%)	7 (70%)	6 (60%)
M1	9 (90%)	10 (100%)	5 (50%)
M2	8 (80%)	9 (90%)	3 (30%)
M3	8 (80%)	7 (70%)	3 (30%)

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-; controle negativo.
(-): Negativo
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

Gráfico 5 – Incidência de patógenos encontrados nos grupos experimentais – São Paulo – 2013



A avaliação de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* foi realizada em todas as amostras positivas para o exame bacteriológico. No grupo combinado foi realizado o exame em 13 amostras (24,5 %) que se mostraram sensível a todos os

antimicrobianos testados. No grupo intramamário, das sete (13,3 %) amostras semeadas, todas se apresentaram sensíveis ao teste, no grupo sistêmico, 23 (43,4 %) amostras foram semeadas e apenas duas (8,6 %) apresentaram alteração no resultado, sendo uma resistente a eritromicina e amoxicilina e intermediário a penicilina e a outra intermediaria a penicilina e amoxicilina. Das dez (18,8 %) amostras semeadas dos grupos controle, todas se apresentaram sensíveis a antimicrobianos.

4.2 RESPOSTA IMUNE

Os resultados para as concentrações lácteas e séricas de imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgM e IgA) estão apresentados em função do tratamento em cada momento, contido nos 15 dias de observação.

4.2.1 IgG1

Na dosagem de IgG_1 no soro lácteo dos animais submetidos aos tratamentos, apenas o grupo intramamário (G2) apresentou um aumento em M1, aeguido de redução gradativa em M2 e M3 (P=0,0054). Ao comparar as médias de concentração dos tratamentos entre os momentos, Não foram observadas diferenças entre os momentos quanto a quantidade de IgG1 (P>0,05), de acordo com a tabela 7.

Tabela 7 – Médias e desvio padrão da concentração de IgG_1 no soro lácteos dos animais submetidos a tratamento e dos grupos controle – São Paulo – 2014

		M0 (mg/dL)	M1 (mg/dL)	M2 (mg/dL)	M3 (mg/dL)	C+	C-	P
G1	Média D. padrão	122,97^{Aa} ± 84,97)	104,99^{Aa} ±143,75)	124,43^{Aa} ±164,89)	207,74^{Aa} ±285,01)	49,67^{a} ± 82,76)	58,23^{a} ± 36,74)	0,5043
G2	Média D. padrão	152,06^{Aab} ± 82,76)	158,93^{Aa} ± 84,87)	106,54^{Aab} ± 36,63)	92,29^{Aab} ± 55,40)	49,67^{b} ± 82,76	58,23^{ab} ± 36,74	0,0054
G3	Média D. padrão	130,66^{Aa} ± 96,64	85,41^{Aa} ± 50,73	89,69^{Aa} ± 52,29	105,87^{Aa} ± 53,35	49,67^{a} ± 82,76	58,23^{a} ± 36,74	0,1514
C+	Média D. padrão	49,67^{A} ± 82,76	49,67^{A} ± 82,76	49,67^{A} ± 82,76	49,67^{A} ± 82,76			
C-	Média D. padrão	58,23^{A} ± 36,74	58,23^{A} ± 36,74	58,23^{A} ± 36,74	58,23^{A} ± 36,74			
P		0,0909	0,1464	0,5168	0,2439			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-; controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

As médias de concentração de IgG1 no soro sanguíneo dos animais submetidos aos diferentes tratamentos estão apresentados na tabela 8. Somente o grupo G1 apresentou diferença e ao longo do tratamento (P=0,0002), em relação aos controles. As concentrações séricas do grupo combinado G1, apresentou-se maiores que os demais grupos e os controles positivo e negativo em todos os momentos experimentais (P<0,0001).

Tabela 8 – Resultados da média e desvio padrão da concentração de IgG1 no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (mg/dL)	M1 (mg/dL)	M2 (mg/dL)	M3 (mg/dL)	C+	C-	P
G1	Média	6518,9^{Aa}	7618,8^{Aa}	7122,3^{Aa}	6659,3^{Aa}	1165,0^{b}	1391,4^{b}	0,0002
	D. padrão	± 2505,2	± 3187,0	± 3564,0	± 3678,8	± 3424,4	± 734,44	
G2	Média	3434,3^{Ba}	3674,6^{Ba}	2168,7^{Ba}	2704,1^{Ba}	1165,0^{a}	1391,4^{a}	0,0945
	D. padrão	± 2467,0	± 2518,3	±1554,2	± 1800,1	± 3424,4	± 734,44	
G3	Média	2173,4^{Ba}	1875,7^{Ba}	1578,47^{Ba}	2142,8^{Ba}	1165,0^{a}	1391,4^{a}	0,3816
	D. padrão	± 1705,7	± 944,43	± 435,32	± 1043,4	± 3424,4	± 734,44	
C+	Média	1165,0^{B}	1165,0^{B}	1165,0^{B}	1165,0^{B}			
	D. padrão	± 3424,4	± 3424,4	± 3424,4	± 3424,4			
C-	Média	1391,4^{B}	1391,4^{B}	1391,4^{B}	1391,4^{B}			
	D. padrão	± 734,44	± 734,44	± 734,44	± 734,44			
P		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-; controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

4.2.2 IgG2

A tabela 9 apresenta os níveis de IgG_2 no leite dos animais pertencentes aos grupos de tratamento. Não houve efeito do tratamento nos animais doentes e nos grupos controles positivo e negativo dentro de cada momento estudo nos diferentes protocolos de tratamento (p>0,05).

Tabela 9 – Médias e desvio padrão da concentração de IgG_2 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (mg/dL)	M1 (mg/dL)	M2 (mg/dL)	M3 (mg/dL)	C+ (mg/dL)	C- (mg/dL)	P
G1	Média	100,88^{Aa}	18,07^{Aa}	74,66^{Aa}	92,37^{Aa}	6,50^{a}	29,04^{a}	0,5645
	D. padrão	±176,14	±24,41	±137,37	±177,03	±5,46	± 16,96	
G2	Média	9,93^{Aab}	1,39^{Aa}	1,17^{Aa}	1,17^{Aa}	6,50^{ab}	29,04^{b}	0,3350
	D. padrão	± 25,36	± 0,62	± 0,65	± 0,68	±5,46	± 16,96	
G3	Média	13,29^{Aa}	38,82^{Aa}	46,67^{Aa}	73,02^{Aa}	6,50^{a}	29,04^{a}	0,3767
	D. padrão	± 13,51	±56,21	± 84,47	±106,08	±5,46	± 16,96	
C+	Média	6,50^{A}	6,50^{A}	6,50^{A}	6,50^{A}			
	D. padrão	±5,46	±5,46	±5,46	±5,46			
C-	Média	29,04^{A}	29,04^{A}	29,04^{A}	29,04^{A}			
	D. padrão	± 16,96	± 16,96	±16,96	±16,96			
P		0,1546	0,1050	0,3205	0,2808			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre coluna

Ao analisar as concentrações de IgG2 sérica dos animais submetido aos diferentes tratamentos pôde se observar que o grupo combinado apresentou um aumento na média de concentração ao longo do tratamento, com médias acima dos valores do grupo positivo e negativo e M0 (P=0,0001). O grupo sistêmico (G3) apresentou redução gradativa de IgG2 sérico a partir no sangue nos momentos M0, ao longo em todos os momentos frente aos grupos controle positivo e negativo (P<0,0001). Ao comparar as médias entre os momentos, o grupo sistêmico apresentou diferença entre os outros grupos de tratamento (p=0,0066), em M1 o grupo combinado foi diferente do grupo sistêmico e dos controles (P<0,0001) e em M2 e M3 apresentou diferença entre os outros grupos e os controles positivo e negativo (P<0,001), conforme apresentado na tabela 10.

Tabela 10 – Médias e desvio padrão da concentração de IgG2 no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (mg/dL)	M1 (mg/dL)	M2 (mg/dL)	M3 (mg/dL)	C+ (mg/dL)	C- (mg/dL)	P
G1	Média	7282,6^{Aab}	11538,9^{Aa}	10961,5^{Aa}	10665,0^{Aa}	2581,87^{b}	2894,40^{b}	0,0001
	D. padrão	± 2539,2	± 5412,3	± 4183,3	± 3596,2	± 546,8	±844,10	
G2	Média	8215,9^{Aa}	7314,6^{ACa}	2345,2^{Ba}	5629,8^{Ba}	2581,87^{a}	2894,40^{a}	0,1704
	D. padrão	± 7610,3	± 4506,8	± 3250,5	± 4103,3	± 546,8	±844,10	
C3	Média	1186,8^{Ba}	1028,18^{Ba}	989,13^{Ca}	761,12^{Ca}	2581,87^{b}	2894,40^{b}	<0,000
	D. padrão	± 812,50	± 790,0	± 700,4	± 574,29	± 546,8	±844,10	1
C+	Média	2581,87^{AB}	2581,87^{BC}	2581,87^{BC}	2581,87^{BC}			
	D. padrão	± 546,8	± 546,8	± 546,8	± 546,8			
C-	Média	2894,40^{AB}	2894,40^{BC}	2894,40^{BC}	2894,40^{BC}			
	D. padrão	±844,10	±844,10	±844,10	±844,10			
P		0,0066	<0,0001	<0,0001	<0,0001			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-; controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

4.2.3 IgM

Na tabela 11 estão dispostos os valores de médias e desvio padrão dos resultados de IgM no soro lácteo dos animais pertencentes aos grupos experimentais. O grupo combinado apresentou queda na concentração ao longo do tratamento, demonstrando diferença entre o momento M0 em relação a M3 e C- (p=0,0051). O grupo intramamário (G2) apresentou valores maiores quando comparados ao controle negativo no memento 2 (P=0,0132).

Tabela 11 – Médias e desvio padrão da concentração de IgM no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (mg/dL)	M1 (mg/dL)	M2 (mg/dL)	M3 (mg/dL)	C+ (mg/dL)	C - (mg/dL)	P=Valor
G1	Média	17,72^{Aa}	15,34^{ABab}	11,35^{Aab}	9,82^{Ab}	8,93^{ab}	7,04^{b}	0,0051
	D. padrão	± 8,11	± 6,65	± 2,67	±5,93	± 2,24	± 3,13	
G2	Média	14,81^{Aa}	19,03^{Aa}	11,07^{Aa}	8,02^{Aa}	8,93^{a}	7,04^{a}	0,0622
	D. padrão	±10,39	± 10,59	± 6,03	± 8,20	± 2,24)	± 3,13	
G3	Média	13,67^{Aa}	11,87^{ABba}	11,15^{Aa}	13,79^{Aa}	8,93^{a}	7,04^{a}	0,2603
	D. padrão	± 6,46	± 3,28	± 5,18	± 8,73	± 2,24	± 3,13	
C+	Média	8,93^{A}	8,93^{AB}	8,93^{A}	8,93^{A}			
	D. padrão	± 2,24	± 2,24	± 2,24	± 2,24			
C-	Média	7,04^{A}	7,04^{B}	7,04^{A}	7,04^{A}			
	D. padrão	± 3,13	± 3,13	± 3,13	± 3,13			
P		0,0924	0,0132	0,3746	0,3231			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, C3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

As concentrações de IgM no sangue dos animais submetidos aos três tratamentos, apresentaram oscilações nas médias ao longo de todo tratamento, apresentando diferença entre nos grupos combinado e intramamário entre os momentos experimentais e os grupos controles positivo e negativo (P<0,0001, e P<0,0001), exceto no momento M3 que o grupo combinado apresentou diferença apenas entre o os animais com mamite subclínica (C+). Ao comparar os momentos experimentais com os tratamentos, nos momentos M2 e M3, os animais do grupo combinado apresentaram medias maiores que o os animais dos grupos controle (P<0,0001) e nos momentos M1 e M3, os animais do grupo intramamário apresentaram-se maiores que os animais sadios (P=0,0006 e P<0,0001), conforme a tabela 12.

Tabela 12 – Médias e desvio padrão da concentração de IgM no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (mg/dL)	M1 (mg/dL)	M2 (mg/dL)	M3 (mg/dL)	C+ (mg/dL)	C- (mg/dL)	P
G1	Média D. padrão	2923,1^{ABa} ± 1304,6	3059,9^{ACa} ± 1512,1	2491,9^{Aa} ±855,6	2781,6^{Aa} ±919,3	346,18^{b} ±104,50	483,40^{b} ±225,57	<0,0001
G2	Média D. padrão	2040,3^{Aa} ± 872,0	2508,4^{Aa} ± 1013,1	1980,4^{Aa} ± 847,8	1837,2^{Bac} ±984,34	346,18^{bd} ± 104,50	483,40^{cd} ±225,57	<0,0001
G3	Média D. padrão	476,5^{Ba} ± 222,3	429,9^{BDa} ± 220,8	319,3^{Ba} ± 137,24	431,9^{Ca} ±200,6	346,18^{a} ± 104,50	483,40^{a} ±225,57	0,2616
C+	Média D. padrão	346,18^{AB} ± 104,50	346,18^{CD} ± 104,50	346,18^{B} ± 104,50	346,18^{C} ±104,50			
C-	Média D. padrão	483,40^{B} ± 225,57	483,40^{CD} ± 225,57	483,40^{B} ± 225,57	483,40^{C} ±225,57			
P		0,0022	0,0006	<0,0001	<0,0001			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

4.2.4 IgA

Na tabela 13, as concentrações lácteas de IgA no soro lácteos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, não apresentaram diferença em relação ao grupo controle (P>0,05). Em relação aos momentos experimentais, no momento M0, os animais que receberam tratamento apenas sistêmico, apresentaram concentrações mais altas que as encontradas no grupo de tratamento intramamário (P=0,0170).

Tabela 13 – Médias e desvio padrão da concentração de IgA no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (mg/dL)	M1 (mg/dL)	M2 (mg/dL)	M3 (mg/dL)	C+	C-	P
G1	Média	18,76^{Aa}	22,24^{Aa}	20,17^{Aa}	25,15^{Aa}	17,29^{a}	34,30^{a}	0,7554
	D. padrão	± 11,58	± 22,67	± 16,61	± 20,78	± 9,89	± 37,95	
G2	Média	16,90^{Aa}	23,22^{Aa}	10,47^{Aa}	21,01^{Aa}	17,29^{a}	34,30^{a}	0,3188
	D. padrão	± 24,19	± 22,68	± 6,11	± 26,73	± 9,89	± 37,95	
G3	Média	59,90^{Ba}	31,00^{Aa}	32,50^{Aa}	52,31^{Aa}	17,29^{a}	34,30^{a}	0,2179
	D. padrão	± 46,65	± 25,05	± 32,75	± 42,43	± 9,89	± 37,95	
C+	Média	17,29^{AB}	17,29^{A}	17,29^{A}	17,29^{A}			
	D. padrão	± 9,89	± 9,89	± 9,89	± 9,89			
C-	Média	34,30^{AB}	34,30^{A}	34,30^{A}	34,30^{A}			
	D. padrão	± 37,95	± 37,95	± 37,95	± 37,95			
P		0,0170	0,7414	0,2054	0,1430			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

Na tabela 14 estão apresentados os níveis de IgG_2 no leite dos animais pertencentes aos grupos de tratamento. Não houve efeito do tratamento nos animais doentes e nos grupos controles positivo e negativo dentro de cada momento estudo nos diferentes protocolos de tratamento ($p>0,05$).

Tabela 14 – Médias e desvio padrão da concentração de IgA no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (mg/dL)	M1 (mg/dL)	M2 (mg/dL)	M3 (mg/dL)	C+ (mg/dL)	C- (mg/dL)	P
G1	Média	135,58^{Aa}	153,57^{Aa}	102,81^{Aa}	141,01^{Aa}	73,67^{a}	103,28^{a}	0,3464
	D. padrão	± 55,42	±81,97	± 58,88	±97,18	± 64,69	± 78,76	
G2	Média	68,27^{Aa}	77,95^{Aa}	69,16^{Aa}	58,86^{Aa}	73,67^{a}	103,28^{a}	0,5550
	D. padrão	± 32,34	± 39,69	± 27,50	± 56,05	± 64,69	± 78,76	
G3	Média	131,40^{Aa}	150,05^{Aa}	82,69^{Aa}	103,96^{Aa}	73,67^{a}	103,28^{a}	0,5935
	D. padrão	± 123,70	± 116,11	± 52,94	± 80,96	± 64,69	± 78,76	
C+	Média	73,67^{A}	73,67^{A}	73,67^{A}	73,67^{A}			
	D. padrão	± 64,69	± 64,69	± 64,69	± 64,69			
C-	Média	103,28^{A}	103,28^{A}	103,28^{A}	103,28^{A}			
	D. padrão	± 78,76	± 78,76	± 78,76	± 78,76			
P		0,2305	0,1420	0,6189	0,1714			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

Os níveis de citocinas no soro lácteo e sanguíneo foram quantificadas nos animais submetidos aos diferentes protocolos de tratamento e nos animais dos grupos controle.

4.2.5 IL-2

As concentrações de IL-2 no leite dos animais tratados, não apresentaram diferenças ao longo do tratamento. Ao comparar os momentos experimentais foi possível observar que o apenas o grupo combinado apresentou maior concentração de IL-2 que os animais do grupo intramamário (P=0,0127), nos demais momentos foram encontrados diferenças, conforme apresentado na tabela 15.

Tabela 15 – Médias e desvio padrão da concentração de IL-2 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+	C-	P
G1	Média	461,9^{Aa}	447,33^{Aa}	470,58^{Aa}	389,7^{Aa}	331,9^{A}	324,9^{A}	0,6506
	D. padrão	± 222,1	± 228,25	± 315,82	± 96,5	± 20,50	± 17,52	
G2	Média	327,0^{Aa}	377,8^{Aa}	298,8^{Aa}	233,8^{Ba}	331,9^{A}	324,9^{A}	0,2743
	D. padrão	± 59,3	± 214,29	± 156,0	± 91,6	± 20,50	± 17,52	
G3	Média	363,1^{Aa}	344,0^{Aa}	360,4^{Aa}	349,0^{ABa}	331,9^{A}	324,9^{A}	0,9860
	D. padrão	± 139,6	± 142,0	± 78,8	± 127,4	± 20,50	± 17,52	
C+	Média	331,9^{A}	331,9^{A}	331,9^{A}	331,9^{AB}			
	D. padrão	± 20,50	± 20,50	± 20,50	± 20,50			
C-	Média	324,9^{A}	324,9^{A}	324,9^{A}	324,9^{AB}			
	D. padrão	± 17,52	± 17,52	± 17,52	± 17,52			
P		0,1920	0,6156	0,3052	0,0127			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

As concentrações séricas de IL-2 dos animais tratados, não apresentaram diferenças ao longo do tratamento. Ao comparar as médias de concentração de IL-2 sérico, observou-se que os animais do grupo combinado (G1), apresentaram-se maiores que as do grupo sistêmico e do controle positivo (C+) (P=0,0141). Uma maior concentração de IL-2 em relação ao controle positivo (C+) também foi encontrada no momento M1 (P=0,0167). O grupo combinado apresentou maior concentração em relação ao grupo intramamário no momento M2 (P=0,0167). Os resultados encontrados estão demonstrados na tabela 16.

Tabela 16 – Médias e desvio padrão da concentração de IL-2 no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+ (pg/mL)	C- (pg/mL)	P
G1	Média	366,5^{ACa}	388,0^{Aa}	375,3^{Aa}	377,4^{Aa}	321,8^{a}	337,8^{a}	0,2316
	D. padrão	± 42,2	± 72,3	± 61,9	± 55,6	± 3,5	± 17,92	
G2	Média	344,8^{ABDa}	336,5^{ABa}	326,2^{Ba}	345,9^{Aa}	321,8^{a}	337,8^{a}	0,1078
	D. padrão	± 21,7	± 19,0	± 13,8	± 26,6	± 3,5	± 17,92	
G3	Média	329,5^{BDa}	335,9^{ABa}	332,9^{ABa}	332,1^{Aa}	321,8^{a}	337,8^{a}	0,6792
	D. padrão	± 9,4	± 19,4	± 16,2	± 72,2	± 3,5	± 17,92	
C+	Média	321,8^{BD}	321,8^{B}	321,8^{AB}	321,8^{A}			
	D. padrão	± 3,5	± 3,5	± 3,5	± 3,5			
C-	Média	337,8^{CD}	337,8^{AB}	337,8^{AB}	337,8^{A}			
	D. padrão	± 17,92	± 17,92	± 17,92	± 17,92			
P		0,0141	0,0167	0,0167	0,2690			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

4.2.6 IL-4

A tabela 17 apresenta os resultados da concentração de IL-4 que foi mensurada nos soro lácteo dos animais e pôde-se observar que o grupo combinado apresentou menor quantidade de IL-4 no leite durante todo tratamento, comparado aos controles do estudo (P<0,0001). O grupo combinado apresentou diferença ao longo no tratamento no momento M0 e no momento M3, com níveis mais baixos que os encontrados nos controle (P=0,0004). Ao comparar os momentos experimentais, observou-se que no momento M0, os três grupos experimentais apresentaram concentrações menores que os dois grupos controle (P<0,0001), no M1, o grupo combinado (G1) e o grupo intramamário (G2) foram menores que o controle positivo (C+) (P=0,0006), no M2 e no M3 os grupos combinado e intramamário se se apresentaram maiores que os controles positivo e negativo (P=0,0013) e o grupo combinado se diferenciou do controle positivo (C+) (P=0,0013).

Tabela 17 – Médias e desvio padrão da concentração de IL-4 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+ (pg/mL)	C- (pg/mL)	P
G1	Média	$89,7^{Aa}$	$88,9^{Aa}$	$88,9^{Aa}$	$86,2^{ACa}$	$170,5^{b}$	$162,5^{b}$	<0,0001
	D. padrão	± 9,74	± 24,6	± 16,6	± 17,1	± 46,4	± 51,0	
G2	Média	$75,6^{Aa}$	$109,49^{ABab}$	$101,8^{ACab}$	$70,4^{Ca}$	$170,5^{b}$	$162,5^{b}$	0,0004
	D. padrão	± 23,4	± 72,8	± 28,5	± 38,5	± 46,4	± 51,0	
G3	Média	$92,8^{Aa}$	$87,4^{Aa}$	$102,7^{ACa}$	$97,4^{ABCa}$	$170,5^{a}$	$162,5^{a}$	0,9268
	D. padrão	± 29,5	± 37,3	± 58,2	± 73,4	± 46,4	± 51,0	
C+	Média	$170,5^{B}$	$170,5^{B}$	$170,5^{B}$	$170,5^{B}$			
	D. padrão	± 46,4	± 46,4	± 46,4	± 46,4			
C -	Média	$162,5^{B}$	$162,5^{AB}$	$162,5^{C}$	$162,5^{A}$			
	D. padrão	± 51,0	± 51,0	± 51,0	± 51,0			
P		<0,0001	0,0066	0,0017	0,0013			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

A tabela 18 apresenta os resultados das médias de concentração de IL-4 sérica nos grupos experimentais. O grupo combinado (G1) apresentou concentrações menores que a dos animais sadios (C-) ao longo de todo o tratamento (P=0,0026). Quando comparou-se os tratamentos em relação ao momento experimental, o grupo de tratamento combinado (G1) mostro-se diferente do controle negativo (C-) nos momentos M0 e M3 (P=0,0127 e P=0,0456).

Tabela 18 – Médias e desvio padrão da concentração de IL-4 no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+ (pg/mL)	C- (pg/mL)	P
G1	Média	100,8^{Aa}	113,6^{Aa}	112,3^{Aa}	105,0^{Aa}	127,2^{a}	255,2^{b}	0,0026
	D. padrão	± 27,6	± 62,6	± 54,8	± 37,4	± 29,2	± 167,1	
G2	Média	154,2^{ABa}	194,4^{Aa}	240,6^{Aa}	138,6^{ABa}	127,2^{a}	255,2^{a}	0,5542
	D. padrão	± 79,8	±183,9	± 268,5	40,9	± 29,2	± 167,1	
G3	Média	151,4^{ABa}	156,5^{Aa}	166,6^{Aa}	173,6^{ABa}	127,2^{a}	255,2^{a}	0,2592
	D. padrão	± 31,7	± 36,1	± 71,6	± 122,9	± 29,2	± 167,1	
C+	Média	127,2^{AB}	127,2^{A}	127,2^{A}	127,2^{AB}			
	D. padrão	± 29,2	± 29,2	± 29,2	± 29,2			
C-	Média	255,2^{B}	255,2^{A}	255,2^{A}	255,2^{B}			
	D. padrão	± 167,1	± 167,1	± 167,1	± 167,1			
P		0,0127	0,2172	0,2939	0,0456			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

4.2.7 IL-6

As concentrações de IL-6 no soro lácteo foram analisadas e pôde-se observar que apenas o grupo intramamário apresentou menores concentrações que os grupos controle nos momentos M0 e M3 (P=0,0005). Ao comparar as médias de concentração entre os momentos, pôde-se observar que no momento M0 os três grupos de tratamento se diferenciaram dos grupos controle (P<0,0001). No momento M1, o grupo combinado diferenciou do grupo sistêmico (P=0,0196). Nos momentos M2 e M3 o grupo intramamário apresentou diferença entre os controles e o combinado apresentou diferença entre os outros grupos de tratamento (P=0,0003 e P<0,0001), conforme apresentado na tabela 19.

Tabela 19 – Médias e desvio padrão da concentração de IL-6 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+ (pg/mL)	C- (pg/mL)	P
G1	Média	643,2^{ACa}	645,9^{Aa}	647,9^{BCa}	611,3^{Aa}	608,5^{a}	609,9^{a}	0,9835
	D. padrão	± 158,8	± 170,3	± 196,2	± 131,3	± 10,0	± 10,3	
G2	Média	289,6^{Ba}	387,48^{ABab}	315,1^{Aab}	210,3^{Ba}	608,5^{b}	609,9^{b}	0,0005
	D. padrão	± 80,0	± 351,9	± 177,9	± 52,2	± 10,0	± 10,3	
G3	Média	284,6^{Ba}	330,8^{Ba}	373,3^{ADa}	408,8^{ABa}	608,5^{a}	609,9^{a}	0,0959
	D. padrão	± 237,6	± 247,9	± 296,3	± 296,3	± 10,0	± 10,3	
C+	Média	608,5^{C}	608,5^{AB}	608,5^{CD}	608,5^{A}			
	D. padrão	± 10,0	± 10,0	± 10,0	± 10,0			
C-	Média	609,9^{C}	609,9^{AB}	609,9^{CD}	609,9^{A}			
	D. padrão	± 10,3	± 10,3	± 10,3	± 10,3			
P		< 0,0001	0,0196	0,0003	< 0,0001			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

As médias de concentrações de IL-6 no sangue dos animais pertencentes aos grupos experimentais, não apresentaram valores significativos ao longo dos tratamento e momentos experimentais (P>0,05), conforme demonstrado na tabela 20.

Tabela 20 – Médias e desvio padrão da concentração de IL-6 no sangue das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+ (pg/mL)	C- (pg/mL)	P
G1	Média	664,1^{Aa}	729,0^{Aa}	759,2^{Aa}	635,8^{Aa}	607,4^{a}	609,9^{a}	0,8096
	D. padrão	± 235,5	± 342,2	± 374,0	± 181,8	± 16,0	± 9,9	
G2	Média	592,9^{Aa}	595,9^{Aa}	595,6^{Aa}	601,6^{Aa}	607,4^{a}	609,9^{a}	0,9381
	D. padrão	± 37,9	± 46,2	± 38,6	± 31,77	± 16,0	± 9,9	
G3	Média	652,6^{Aa}	692,1^{Aa}	708,6^{Aa}	638,5^{Aa}	607,4^{Aa}	609,9^{Aa}	0,5090
	D. padrão	± 96,2	± 150,2	± 183,6	± 69,7	± 16,0	± 9,9	
C+	Média	607,4^{A}	607,4^{Aa}	607,4^{Aa}	607,4^{Aa}			
	D. padrão	± 16,0	± 16,0	± 16,0	± 16,0			
C-	Média	609,9^{A}	609,9^{Aa}	609,9^{Aa}	609,9^{Aa}			
	D. padrão	± 9,9	± 9,9	± 9,9	± 9,9			
P		0,7366	0,5116	0,4099	0,9074			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

4.2.8 IL-8

As amostras de leite coletadas foram analisadas quanto à concentração de IL-8. Os grupos intramamário e sistêmico apresentaram medias de concentrações muito mais baixas nos quatro momentos experimentais quando comparada aos grupos controle (P<0,0001). Comparando entre os momentos o grupo combinado apresentou concentrações maiores que os demais grupos e os animais dos tratamentos intramamário e sistêmico apresentaram diferença em relação aos controles nos quatro momentos experimentais (P<0,0001), conforme demonstra a tabela 21.

Tabela 21 – Médias e desvio padrão da concentração de IL-8 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+ (pg/mL)	C- (pg/mL)	P
G1	Média	399,3^{Aa}	423,0^{Aa}	421,6^{Aa}	406,4^{Aa}	522,9^{a}	523,7^{a}	0,5325
	D. padrão	± 130,7	± 17,0	± 207,7	± 168,5	± 2,3	± 2,98	
G2	Média	184,7^{Ba}	211,5^{Ba}	171,9^{Ba}	150,9^{Ba}	522,9^{b}	523,7^{b}	<0,0001
	D. padrão	± 74,0	± 138,1	± 45,2	±43,6	± 2,3	± 2,98	
G3	Média	173,8^{Ba}	156,0^{Ba}	209,2^{Ba}	235,1^{Ba}	522,9^{b}	523,7^{b}	<0,0001
	D. padrão	± 54,60	± 102,2	± 123,3	± 161,5	± 2,3	± 2,98	
C+	Média	522,9^{A}	522,9^{A}	522,9^{A}	522,9^{A}			
	D. padrão	± 2,3	± 2,3	± 2,3	± 2,3			
C-	Média	523,7^{A}	523,7^{A}	523,7^{A}	523,7^{A}			
	D. padrão	± 2,98	± 2,98	± 2,98)	± 2,98			
P		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

Foi realizada a quantificação de IL-8 nas amostras de soro sanguíneo dos animais selecionados. Com os resultados apresentados na tabela 22, pode observar que os três grupos de tratamento não apresentaram diferença entra os momentos e os grupos controle (P>0,05).

Tabela 22 – Médias e desvio padrão dos níveis de IL-8 no soro sanguíneo das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+	C-	P
G1	Média	486,6^{Aa}	498,0^{Aa}	484,1^{Aa}	519,0^{Aa}	523,1^{a}	526,7^{a}	0,8422
	D. padrão	± 77,2	± 107,2	± 62,7	± 109,7	± 3,63	± 2,4	
G2	Média	504,8^{Aa}	510,7^{Aa}	532,5^{Aa}	530,2^{Aa}	523,1^{a}	526,7^{a}	0,8097
	D. padrão	± 47,4	± 52,2	± 71,0	± 54,7	± 3,63	± 2,4	
G3	Média	528,4^{Aa}	533,9^{Aa}	527,6^{Aa}	534,2^{Aa}	523,1^{a}	526,7^{a}	0,7002
	D. padrão	± 9,4	± 25,5	± 4,8	± 17,7	± 3,63	± 2,4	
C+	Média	523,1^{A}	523,1^{A}	523,1^{A}	523,1^{A}			
	D. padrão	± 3,63	± 3,63	± 3,63	± 3,63			
C-	Média	526,7^{A}	526,7^{A}	526,7^{A}	526,7^{A}			
	D. padrão	± 2,4	± 2,4	± 2,4	± 2,4			
P		0,3104	0,7645	0,2059	0,9883			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

4.2.9 IL-10

As médias de concentração de IL-10 no leite dos animais do grupo combinado (G1) apresentaram menor valor nos momentos M1 e M3 e os animais do controle positivo (C+) (P=0,0326). No grupo intramamário, a média da concentração apresentou um aumento em M1 e M2, seguido de uma redução em M3, apresentando diferença significativa entre os quatro momentos experimentais e o controle C+ (P=0,0053). No M0 e no M1, as amostras de leite do grupo controle positivo apresentaram maior quantidade de IL-10 do que as amostras de leite do grupo intramamário (P=0,0112 e P=0,0339). No M2,os três grupo de tratamento apresentaram menor concentração que os animais do grupo positivo (P=0,0117). Os resultados estão apresentados na tabela 23.

Tabela 23 – Médias e desvio padrão da concentração de IL-10 no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+	C-	P
G1	Média	522,1^{ABab}	468,0^{ABa}	508,8^{Aab}	497,0^{Aa}	852,5^{b}	422,9^{a}	0,0326
	D. padrão	± 219,2	± 152,4	± 202,4	± 196,7	± 402,2	± 112,9	
G2	Média	360,9^{Aa}	420,3^{Aa}	423,5^{Aa}	388,2^{Aa}	852,5^{b}	422,9^{a}	0,0053
	D. padrão	± 168,4	± 295,5	± 124,8	± 171,0	± 402,2	± 112,9	
G3	Média	534,6^{ABa}	519,3^{ABa}	469,0^{Aa}	513,8^{Aa}	852,5^{a}	422,9^{a}	0,2587
	D. padrão	± 252,2	± 226,0	± 221,33	± 441,8	± 402,2	± 112,9	
C+	Média	852,5^{B}	852,5^{B}	852,5^{B}	852,5^{A}			
	D. padrão	± 402,2	± 402,2	± 402,2	± 402,2			
C-	Média	422,9^{AB}	422,9^{AB}	422,9^{A}	422,9^{A}			
	D. padrão	± 112,9	± 112,9	± 112,9	± 112,9			
P		0,0112	0,0339	0,0117	0,0880			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

As médias de concentração de IL-10 no soro sanguíneo das vacas submetidas a tratamento não apresentaram diferença entre os momentos e os grupos controles, demostrando comportamento distinto para cada protocolo de tratamento realizado (P>0,05), conforme apresentado na tabela 24.

Tabela 24 – Médias e desvio padrão dos níveis de IL-10 no soro sanguíneo das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+	C-	P
G1	Média	594,9^{Aa}	655,1^{Aa}	639,1^{Aa}	619,8^{Aa}	246,3^{a}	447,6^{a}	0,8795
	D. padrão	± 645,0	± 711,3	± 766,2	± 689,3	± 166,7	±474,1	
G2	Média	284,5^{Aa}	300,3^{Aa}	288,8^{Aa}	437,6^{Aa}	246,3^{a}	447,6^{a}	0,5824
	D. padrão	± 67,5	± 158,9	± 153,5	± 419,9	± 166,7	±474,1	
G3	Média	428,5^{Aa}	546,6^{Aa}	576,1^{Aa}	455,0^{Aa}	246,3^{a}	447,6^{a}	0,7278
	D. padrão	± 259,0	± 379,7	± 482,7	± 427,5	± 166,7	±474,1	
C+	Média	246,3^{A}	246,3^{A}	246,3^{A}	246,3^{A}			
	D. padrão	± 166,7	± 166,7	± 166,7	± 166,7			
C-	Média	447,6^{A}	447,6^{A}	447,6^{A}	447,6^{A}			
	D. padrão	±474,1	±474,1	±474,1	±474,1			
P		0,4085	0,3529	0,4320	0,7371			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

4.2.10 INF – γ

As concentrações de INF-γ das amostras de soro lácteo e no soro sanguíneo, não apresentaram alteração ao longo do tratamento e em relação aos momentos, comparados aos animais sadios (C-) e animais com mamite subclínica (P>0,05), conforme demostrado na tabela 25 e 26.

Tabela 25 – Médias e desvio padrão da concentração de IFN - γ no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+ (pg/mL)	C- (pg/mL)	P
G1	Média	1700,1^{Aa}	2209,2^{Aa}	2244,4^{Aa}	1725,0^{Aa}	2462,7^{a}	2616,8^{a}	0,1602
	D. padrão	± 636,2	± 986,4	± 847,0	± 751,4	± 709,6	± 692,8	
G2	Média	2176,7^{Aa}	3142,9^{Aa}	2935,1^{Aa}	2894,1^{Aa}	2462,7^{a}	2616,8^{a}	0,5394
	D. padrão	± 1106,3	± 1188,5	± 1188,5	± 899,47	± 709,6	± 692,8	
G3	Média	2659,5^{Aa}	2171,21^{Aa}	2028,3^{Aa}	2407,2^{Aa}	2462,7^{a}	2616,8^{a}	0,7968
	D. padrão	± 964,1	± 1082,4	± 988,4	± 1492,8	± 709,6	± 692,8	
C+	Média	2462,7^{A}	2462,7^{A}	2462,7^{A}	2462,7^{A}			
	D. padrão	± 709,6	± 709,6	± 709,6	± 709,6			
C-	Média	2616,8^{A}	2616,8^{A}	2616,8^{A}	2616,8^{A}			
	D. padrão	± 692,8	± 692,8	± 692,8	± 692,8			
P		0,1452	0,3955	0,2943	0,1622			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

Tabela 26 – Médias e desvio padrão dos níveis de IFN - γ no soro sanguíneo das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+ (pg/mL)	C- (pg/mL)	P
G1	Média	2256,0^{Aa}	2381,7^{Aa}	2144,6^{Aa}	1942,1^{Aa}	2708,72^{a}	3510,2^{a}	0,0541
	D. padrão	± 823,4	± 940,4	± 1027,8	± 902	± 874,2	± 589,5	
G2	Média	2712,2^{Aa}	2961,1^{Aa}	3049,02^{Aa}	2938,3^{Aa}	2708,72^{a}	3510,2^{a}	0,9284
	D. padrão	±1359,7	± 1656,5	± 1480,3	± 1396,4	± 874,2	± 589,5	
G3	Média	3408,5^{Aa}	3834,7^{Aa}	3574,7^{Aa}	3686,8^{Aa}	2708,72^{a}	3510,2^{a}	0,9758
	D. padrão	± 1767,9	±3615,7	2560,0	± 2311,9	± 874,2	± 589,5	
C+	Média	2708,72^{A}	2708,72^{A}	2708,72^{A}	2708,72^{A}			
	D. padrão	± 874,2	± 874,2	± 874,2	± 874,2			
C-	Média	3510,2^{A}	3510,2^{A}	3510,2^{A}	3510,2^{A}			
	D. padrão	± 589,5	± 589,5	± 589,5	± 589,5			
P		0,2441	0,5950	0,3369	0,1195			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

4.2.11 TNF-α

Na tabela 27 e 28 estão apresentados os valores das médias de TNF-α do leite e do sangue dos grupos submetidos a tratamento. Analisando os resultados pode-se observar que os diferentes protocolos de tratamentos não apresentaram diferença entre os momentos experimentais e os diferentes protocolos de tratamento (p>0,005).

Tabela 27 – Resultados da média e desvio padrão da concentração de TNF-α no leite das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+ (pg/mL)	C - (pg/mL)	P
G1	Média	1933,0^{Aa}	1968,6^{Aa}	2157,9^{Aa}	1861,5^{Aa}	1660,3^{a}	1651,6^{a}	0,7119
	D. padrão	± 601,4	± 942,4	± 845,0	± 535,1	± 9,4	± 8,9	
G2	Média	1327,2^{Aa}	1800,9^{As}	1602,5^{As}	1753,0^{Aa}	1660,3^{a}	1651,6^{a}	0,7731
	D. padrão	± 871,9	± 664,3	± 994,0	± 699,0	± 9,4	± 8,9	
G3	Média	1952,9^{Aa}	1626,0^{As}	1543,6^{As}	1825,4^{Aa}	1660,3^{a}	1651,6^{a}	0,8281
	D. padrão	± 557,9	± 969,6	± 496,2	± 1006,2	± 9,4	± 8,9	
C+	Média	1660,3^{A}	1660,3^{A}	1660,3^{A}	1660,3^{A}			
	D. padrão	± 9,4	± 9,4	± 9,4	± 9,4			
C-	Média	1651,6^{A}	1651,6^{A}	1651,6^{A}	1651,6^{A}			
	D. padrão	± 8,9	± 8,9	± 8,9	± 8,9			
P		0,1613	0,8648	0,3308	0,9687			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

Tabela 28 – Resultados da média e desvio padrão dos níveis de TNF-α no soro sanguíneo das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

		M0 (pg/mL)	M1 (pg/mL)	M2 (pg/mL)	M3 (pg/mL)	C+ (pg/mL)	C- (pg/mL)	P
G1	Média	1998,2^{Aa}	2131,2^{Aa}	2112,2^{Aa}	1968,3^{Aa}	1651,5^{a}	1668,2^{a}	0,0941
	D. padrão	± 1648,6	± 591,1	± 471,2	± 236,3	± 24,3	± 21,8	
G2	Média	1870,9^{ABa}	1893,1^{ABa}	1873,2^{ABa}	1908,7^{ABa}	1651,5^{a}	1668,2^{a}	0,2442
	D. padrão	± 231,7	± 231,95	± 251,3	± 328,3	± 24,3	± 21,8	
G3	Média	1645,7^{Ba}	1688,9^{Ba}	1680,0^{Ba}	1642,9^{Ba}	1651,5^{a}	1668,2^{a}	0,7606
	D. padrão	± 33,1	± 130,4	± 102,6	± 34,9	± 24,3	± 21,8	
C+	Média	1651,5^{B}	1651,5^{AB}	1651,5^{B}	1651,5^{AB}			
	D. padrão	± 24,3	± 24,3	± 24,3	± 24,3			
C-	Média	1668,2^{B}	1668,2^{AB}	1668,2^{B}	1668,2^{AB}			
	D. padrão	± 21,8	± 21,8	± 21,8	± 21,8			
P		0,0010	0,0258	0,0073	0,0040			

M0: Antes do início do tratamento; M1: dois dias após o término do tratamento; M2: cinco dias após o término do tratamento; M3: décimo segundo dia após o término do tratamento. G1: tratamento combinado; G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico; C+: controle positivo e C-: controle negativo.
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre linhas
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre colunas

4.2.12 Correlação

Na tabela 29 estão apresentados os índices de correlação (R^2) entre as variáveis imunológicas (imunoglobulinas e citocinas) séricas e do soro lácteos. No grupo G1 as correlações das imunoglobulinas foram consideradas fracas (entre 0,50 a 0,69), observou-se correlação positiva moderada entre as citocinas séricas e lácteas IL6 e TNF α (entre 0,7 a 0,8) e correlação negativa forte para a IL10 (entre 0,81 a1). Para o G2 as correlações para as imunoglobulinas séricas e lácteas foram fortes e positivas para a IgG1e IgM e moderada e positiva para a IgG2. Observou-se também correlação forte e positiva para as citocinas IL4 e INF γ e moderada e positiva para TNFα, e moderada e negativa para IL8. Para o G3, houve uma forte correlação negativa para IgG2 e moderada positiva para IgG1 e IgM. Para as citocinas observou-se correlação negativa moderada para as citocinas TNFα e IL10.

Tabela 29 – Índices de correlação séricas e lácteas para as variáveis subclasses de imunoglobulinas e citocinas das vacas submetidas a tratamento e dos animais controle – São Paulo – 2013

Correlação das análises séricas e do soro lácteo (R^2)				
		G1	G2	G3
Imunoglubulinas	IgG1	- 0,56	+ 0,88	+ 0,76
	IgG2	- 0,67	+0,76	- 0,99
	IgM	+ 0,65	+ 0,99	+ 0,72
	IgA	+ 0,65	+ 0,11	- 0,27
Citocinas	IL2	- 022	- 0,27	- 0,78
	IL4	+ 0,03	+ 0,83	+ 0,65
	IL 6	+ 0,79	+ 0,02	- 0,04
	IL8	- 0,18	- 0,72	+ 0,06
	IL10	- 0,82	- 0,16	- 0,77
	INF- γ	+ 0,45	+ 0,89	- 0,56
	TNF-α	+ 0,72	+ 0,78	- 0,89

G1: tratamento combinado; G2 tra G2 tratamento intramamário, G3: tratamento sistêmico

5 DISCUSSÃO

A motivação deste estudo foi a um desafio concreto encontrado na cadeira produtiva de leite, ou seja, as causas de fracasso no tratamento e a diversidade de protocolos terapêuticos. Considerando-se que em propriedades especializadas que adotam sistemas de controle de mamite, a tomada de decisão e avaliação da resposta ao tratamento, deve ser feita pelo ordenhador treinado para tal (PINZÓN-SANCHEZ, RUEGG; 2011), cabe à pesquisa, identificar e divulgar interferências além do efeito antimicrobiano e manejo, como a resposta imune, para municiar protocolos futuros ou mesmo balizar os atuais.

Muitas vezes a resposta ao tratamento é avaliada em curto prazo, geralmente no período que coincide com o intervalo de carência do medicamento para que esse animal receba alta e o leite retorne à comercialização. Neste cenário de avaliação da cura clínica, sem percepção do prognóstico antes do tratamento e respectiva cura bacteriológica, os motivos de insucesso ficam obscuros e devem ser analisados precocemente.

O presente estudo não objetivou avaliar a resposta ao tratamento propriamente dita, mas utilizou-se desta para identificar variações na polarização da resposta imune adotada pelo animal frente à doença (SORDILLO; STREICHER 2002, BANNERMAN 2009). Este modelo de polarização por meio de avaliação de citocinas é mais empregado nas avaliações colostrais (MADUREIRA, 2012) e de co-morbidades (BLAGITZ, 2011; BONAGURA, 2013) e muito contribuíram para as superações metodológicas do presente estudo.

Todos os animais considerados sadios (controle negativo) ou com mamite subclínica (controle positivo), não apresentaram diferença entre si nas análises de imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgM, IgA) e citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IlL-8, IL-10, TNF-α e INF-γ) realizadas no presente estudo, corroborando o fato destes animais, quando infectados, se manterem como fonte de infecção para os demais, mas preservarem um perfil estabilidade imunológica,

No grupo que recebeu tratamento com enrofloxacina intramuscular e cefquinoma intramamário, todos os animais obtiveram cura clínica durante todo o período experimental e cura bacteriológica até o M2. Analisando-se esse aparente

fracasso no tratamento em duas vacas, devemos considerar que as mesmas, não apresentavam inflamação e que esse isolamento poderia passar a configurar mamite, após os quinze dias do estudo ou evoluir para resolução espontânea também descrita para a doença com evolução imunológica avaliada por meio do comportamento dos diferentes isotipos de imunoglobulinas e citocinas para identificar perfis Th1 ou Th2 como Burton e Erskine (2003) consideraram determinantes para cura ou cronificação da doença, ou alteração do perfil desta.

Avaliando-se a resposta imunológica predominante observa-se a ausência de um perfil definido nos tempos experimentais e observa-se também uma não sincronia entre a resposta sérica e láctea. Pelas variações observadas entre os momentos experimentais no sangue e no leite, sugere-se que pelo tratamento ter empregado duas vias de administração, a primeiro manifestação ocorreu no sangue, iniciando-se pelo aumento de IL-6 no M1, provocando os aumentos séricos de IgG1 e IgG2. Neste mesmo momento, na glândula mamária submetida a altas concentrações de antimicrobiano, a infecção estava sendo debelada e a inflamação tornava-se desnecessária. Subsequentemente (M2), no sangue perpetuava-se a mobilização da resposta inflamatória, observada aumento de IgG1, IgG2, TNF-a e IL-4 e no leite, iniciava-se a resolução da inflamação com aumento de IL-10. A resposta imune mamária regida por IL-10 esta capaz de inibir tanto estímulos Th1, quanto Th2 (THOMPSON-SNIPES *et al.*, 1991; VARELLA e FORTES, 2001, MITELMAN *et al*., 2009; HARTOG *et al*., 2011). A IL-10 é uma citocina imunomoduladora com padrão Th2, capaz de inibir as citocinas inflamatórias do padrão Th1, ativando a resposta imune humoral, caracterizando a atipia do perfil imunológico mamário identificado no final do tratamento. As concentrações de IgG1 e IgG2 no sangue apresentaram proporções semelhantes. O comportamento das imunoglobulinas plasmáticas IgG1 e IgG2 também se refletiram no leite e mantiveram as proporções descritas por Butler (1994)

Esse balizamento da resposta imune presente pela IL-10 é reforçado pela forte correlação negativa entre sangue e leite, conforme descrito anteriormente, a existência de uma relação entre IL-6:IL10 com valores maiores em animais saudáveis (BURTON *et al*., (2009), apontam a relação entre IL-6:IL-10 como a mais importante fonte indicadora de prognóstico, com valores significativamente maiores em animais saudáveis em comparação a potros com sepse.

Considerando-se o grupo submetido ao tratamento intramámario, observou-se que no início do tratamento (M1) os animais demostraram cura clínica e microbiológica, demonstrados pela negatividade ao fundo escuro e CMT, acrescidos da diminuição da CCS e negatividade no microbiológico. Esse cenário de cura clínica e bacteriológica, não se manteve. Imunologicamente o perfil predominante neste primeiro momento pós-tratamento, foi Th2, observado pela correlação positiva e forte de IgG1 e IL-4 e respectivo aumento das concentrações láctea de IgG1 e IL-4 em relação aos controles. Esta última diminuiu o final do período experimental, acompanhando o período em que houve o ressurgimento da doença, alguns animais voltaram a apresentar isolamento bacteriano e um animal manifestou grumos. A partir de então o perfil Th2 foi atenuado, observados pela diminuição de Il-4, a concentração láctea de IgG1 se ao igualou ao do controle e curiosamente não houve aumento de IgG2, bem como reduziu-se a secreção de Il-6.

Esse desbalanço de Th2, sem estabelecimento de Th1, pode ter definido a recrudescência da doença manifesta clínica e bacteriologicamente no referido grupo e talvez essa evolução reforçasse as indicações de tratamento Intramamário prolongada, como descrito por Kasravi et al., (2008), que observou redução da CCS e eliminação da mastite subclínica em vacas lactantes ao administrar cefquinoma intamamário por período extendido.

No grupo submetido exclusivamente ao tratamento sistêmico, houve cura clínica, embora não absoluta, com persistência do quadro subclínico, acompanhado por 40% de ausência de isolamento bacteriano acompanhado de inflamação no final da observação, como referido por Suojala et al. (2010). Estes autores, ao administrarem enrofloxacina sistêmica não observaram maior cura clínica e bacteriológica na mamite clínica causada por *E. coli.* A proporção de recorrência em animais tratados foi maior (40%) que os relatados em trabalhos que usaram um maior período para avaliar a cura bacteriológica, 18% em 60 dias (PINZÓN-SANCHEZ, RUEGG; 2011), 17% em 30 dias (HOE e RUEGG, 2005) e 23%em 90 dias (WENZ et al. 2005). O intervalo utilizado para definir a cura bacteriológica no presente estudo foi de 15 após o início do tratamento porque a preocupação era buscar um indicador prognóstico precoce. Não há consenso quanto ao intervalo necessário para definir a cura bacteriológica. Alguns pesquisadores (WENZ et al., 2005; BAR et al, 2007 ; APPARAO et al, 2009) utilizam o intervalo 8-90 dias para considerar um novo processo infeccioso ou uma recidiva e diferem quanto a

definição do intervalo que pode ser contado a partir do dia do diagnóstico, a partir do ultimo dia de tratamento ou do ultimo dia do período de carência. Os animais selecionados pertenciam ao mesmo rebanho, eram submetidos a mesma dieta e foram tratados na mesma época. Apesar da homogeneidade atribuída aos animais, a diferença observada na cura clínica e bacteriológica em cada protocolo de tratamento, é justificada pelo fato do sucesso no tratamento para mamite clínica depender de diferentes fatores relacionados à vaca, ao patógeno e ao medicamento de escolha e, fatores que afetam a eficácia do tratamento como a idade, o estágio de lactação e a resposta imune do animal (CONSTABLE; MORIN, 2003; DELUYKER et al, 2005;. BRADLEY E GREEN, 2009, RENTALA et al., 2002).

Neste cenário de tratamento ineficaz, o perfil imunológico predominante evidenciado no leite parece ter sido definido pelo perfil sérico. Sistemicamente houve diminuição de IgG2 no M3, possuindo uma forte correlação negativa com a IgG2 láctea, justificando a afirmação de que no leite com mamite a IgG2 se torna a imunoglobulina predominantes no leite para o combate dos patógenos através da fagocitose de neutrófilos (BURTON E ERSKINE, 2003; WELLNITZ; ARNOLD; BRUCKMAIER, 2013), caracterizando uma resposta mamária tardia. Possivelmente essa resposta tardia foi perpetuada pelos altos níveis de IL-6 láctea que se mantiveram elevados em todo tratamento, demonstrando uma tentativa, ainda que insuficiente de debelar a infecção, como sugerido por Sakemi *et al.* (2011). Cabe ressaltar que o aumento da IL-6 foi acompanhado pela diminuição da Il-8 no leite. Ambas apresentam efeito quimiotáxico.

A utilização de citocinas na imunoterapia da mamite já foi estudada e suas indicações e limitações ponderadas (SANCHEZ et al., 1996; ERSKINE et al., 1998). Neste estudo buscando identificar na evolução dos tratamentos a sinalização que prognosticaria o efeito do tratamento, ficou patente que isto é possível e deve considerar a pressão que o efeito do antibiótico gera na disponibilidade de antígeno para a montagem da resposta imune. Considerando a interferência do protocolo terapêutico na dinâmica da infecção, o tempo de observação devera ser mais longo e marcadores de persistência de infecção e reinfecção também devem ser incluídos. Essas considerações não desmerecem o perfil inovador da proposta e por isso sugere-se a inclusão destes critérios em estudos futuros que ousem observar o comportamento imune em infecções naturais.

6 CONCLUSÃO

A eficiência antimicrobiana, se não acompanhada da imunológica, pode ser insuficiente para garantir o bom prognóstico do tratamento e duas semanas são insuficientes para observação da dinâmica da infecção e respectiva resposta imune.

Tratamento antimicrobiano massivo, exemplificado pelo tratamento combinado, pode dificultar a caracterização precoce da resposta imune, ao contrário do tratamento antimicrobiano ineficiente que pode vir a montar essa resposta, mas ser suficiente para debelar precocemente a infecção.

É sugestivo que, caso o ambiente favoreça a montagem da resposta Th2 mamária o prognóstico possa ser bom.

REFERÊNCIAS

APPARAO, M. D.; RUEGG, P. L.; LAGO, A.; GODDEN, S.; BEY, R.; LESLIE, K. Relationship between in vitro susceptibility test results and treatment outcomes for gram-positive mastitis pathogens following treatment with cephapirin sodium. **Journal Dairy Science,** v. 92, p. 2589–2597, 2009.

BANNERMAN, D. D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. **Journal of Animal Sciences**, v. 87, p.10-25, 2009.

BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; LEE, J. W.; ZHAO, X.; HOPE, J. C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Elicit Differential Innate Immune Responses following Intramammary Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,** v. 11, n. 3, p. 463-472, 2004.

BAR, D.; GRÖHN, Y. T.; BENNETT, G.; GONZALEZ, R. N.; HERTL, J. A.; SCHULTE, H. F.; TAUER, L. W.; WELCOME, F. L.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of repeated episodes of generic clinical mastitis on milk yield in dairy cows. **Journal Dairy Science,** v. 90, p. 4643–4653, 2007.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibilidad tests by standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BAUMGARTH, N.; TUNG, J. W; HERZENBERG, L. A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. **Springer Seminars in Immunopathology.** v. 26, p. 347–362, 2005.

BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnósticos. In: BIRGUEL, E. H.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária,1982, p. 249-260.

BLAGITZ, M. G. **Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos**, 2011, 161f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BONAGURA, G. **Avaliação das concentrações séricas e lácteas de citocinas em vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos**, 2013, 146f. Tese (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BRADLEY, A. J.; GREEN. M. J. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. **Journal Dairy Science,** v. 92, p. 1941–1953, 2009.

BROWN, W.C., RICE-FICHT, A.C., ESTES, D.M. Bovine type 1 and type 2 responses. **Veterinary Immunology and Immunophatology**, v. 63 n. 2, p. 45-55, 1998.

BURTON, J. L.; ERSKINE, R. J. Immunity and mastitis Some new ideas for an old disease. **Veterinary Clinics of North America:** food animal practice**,** v. 19, p. 1–45, 2003.

BUTLER, J. E. Passive immunity and immunoglobulin diversity. **Indigenous Antimicrobial Agents of Milk-recent Developments**, v. 9404, v. 4, p. 14-50, 1994. Special Issue.

CONSTABLE, P.; MORIN, D. Treatment of clinical mastitis using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. **Veterinary Clinics of North America:** Food Animal Practice, v. 19, p. 139–155, 2003.

COSTA, E. O.; BENITIS, N. R.; GUERRA, J. L.; GUERRA, J. L.; MELVILLE, P. A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.47, p.99-103, 2000.

DELUYKER, H. A.; VAN OYE, S. N.; BOUCHER. J. F. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows **Journal Dairy Science,** v. 88, p.604–614, 2005.

ERSKINE, R. J.; BARTLETT, P. C.; TAVERNIER, S. R.; FOWLER, L. H.; WALKER, R. D.; SEGUIN, J. H.; SHUSTER, D. Recombinant bovine interlukin-2 dry cow therapy: efficacy to cure and prevent intramammary infections, safety and effect on gestation. **Journal Dairy Science,** v. 81, p. 107–115, 1998.

ERSKINE, R. J., KIRK, J. H., TYLER, J. W., DEGRAVES, F. J. Advances in the therapy for mastitis. **The Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice**. v. 9, n. 3, p. 499-513, 1993.

ESTES, D. M., BROWN, W. C., HIRANO, A. CD40 ligand-dependent signaling of bovine B lymphocyte development and differentiation. **Veterinary Immunology and Immunophatology**, n.63 v. 2, p. 15-20, 1998.

FEITOSA, F. L. F. Semiologia veterinária a arte do diagnóstico. In: BIRGEL, E. H. **Semiologia da glândula mamária de ruminantes**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 324.

HARADA, A. SEKIDO, N., AKAHOSHI, T., WADA, T., MUKAIDA, N., MATSUSHIMA, K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **Journal of Leukocyte Biology,** v.56, n.5, p.559-564. 1994.

HARMON, R. J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. **Microbiological procedures for use in the diagnosis of bovine udder infections.** Arlington, VA: National Mastitis Council, 1990.

HARTOG, G. D.; SAVELKOUL, H. F. J.; SCHOEMAKER, R.; TIJAAR, E.; WESTPHAL, A. H.; RUITER, T.; WEG-SCRIJVER, E. V.; JOOST VAN NEERVEN, R. J. Modulation of human immune responses by bovine interleukin-10. **PLOS Medicine**, v. 6, p. 1-10, 2011.

HOE, F. G. H. A; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. **Journal American Veterinary Medicine Association,** v. 227, p. 1461–1468, 2005

HOEBEN, D.; MONTFARDINI, E.; BURVENICH, C.; HAMANN, J.; Treatment of acute Escherichia coli mastitis in cows with enrofloxacin: effect on clinical symptoms and chemiluminescence of circulating neutrophils. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 485–502, 2000.

KASRAVI R., BOLOURCHI M., FARZANEH N., SEIFI H.A., BARIN A., HOVARESHTI P., GHARAGOZLOU F. Efficacy of conventional and extended intra-mammary treatment of persistent sub-clinical mastitis with cefquinome in lactating dairy cows. **Tropical Animal Health and Production,** v. 43 p. 1203-1210, 2011**.**

KATHOLM, J.; ANDERSEN, P. H. Severe coliform mastitis in practice: efficacy of a therapy regimen not including antibiotics. In: Congress of World Buiatrics, Sydney, Australia**. Proceedings of XX Congress of World Buiatrics**, v. 1, p. 261–264, 1998.

KOESS, C.; HAMANN, J. Detection of mastites in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 225-232, 2008.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Willians ; Wilkins, 1994, 1599p.

LANGONI, H.; ARAUJO, W. N.; SILVA, A. V.; SOUZA, L. C. Tratamento da mastite bovina com amoxicilica e enrofloxacina bem como a sua associação. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 177-180, 2000.

LEE, J. W.; PAAPE, M. J.; ELSASSER, T. H.; ZHAO, X. Recombinant soluble CD14 reduces severity of intramammary infection by *Escherichia coli*. **Infection and Immunity,** v. 71, n. 7, p. 4034-4039, 2003.

LENNETTE, E. M.; BALOWS, A.; HANSLER Jr., W. J. **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985, 254 p.

LEVISON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 415p.

LIMBERT, M., ISERT, D., KLESEL, N., MARKUS, A., SEEGER, K., SEIBERT, G., SCHERINNER, E. Antibacterial activities *in vitro* and *in vivo* and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,** v. 35, n. 1, p. 14-19, 1991.

MADUREIRA, K. M. **Citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α, INF-γ no sangue e colostro de fêmeas bovinas da raça Holandesa. Importância na transferência da imunidade passiva**, 2012, 106 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

MEHRZAD, J., DUCHATEAU, L., BURVENICH, C. Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows during early lactation**. Veterinary Microbiology**, v.134, p. 106-112, 2009.

MITELMAN, A. K.; BUCCHERI, V.; PRACCHIA, L. F.; RUBENS, C. V.; POPPE, S.; CAVALCANTE, A. M. M. P.; MONTEIRO, S. M. Quantificação das citocinas séricas Th1/Th2 por citometria de fluxo no linfoma de Hodgkin clássico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n.4, p. 260-266, 2009.

OCHSENBEIN, A. F.; FEHR, T.; LUTZ, C.; SUTER, M.; BROMBACHER, F.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. M. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. **Science,** v. 286, p. 2156–2159, 1999.

OVIEDO-BOYSO, J., VALDEZ-ALARCÓN, J.J., CAJERO-JUÁREZ, M., OCHOA-ZARZOSA, A., LÓPEZ-MEZA, J.E., BRAVO-PATIÑO, A., BAIZABEL-AGUIRRE, V.M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v.54, n.4, p.399-409, 2007.

PAAPE, M.J., CAPUCO, A.V., VAN OOSTVELDT, K., BURVENICH, C. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology,** v.480, p.259-277, 2000.

PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; ZHAO, X.; LEE, J. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. **Veterinary Research,** v. 34, p. 597–627, 2003.

PAUL, W. E.; SEDER, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 241-251, 1994.

PLOEGAERT, T. C. W.; WIJGA, S.; TIJHAAR, E.; VAN DER POEL, J. J.; LAM, T. J. G. M.; SAVELKOUL, H. F. J.; PARMENTIER, H. K.; VAN ARENDONK, J. A. M. Genetic variation of natural antibodies in milk of Dutch Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5467–73, 2010.

PLOEGAERT, T. C. W.; TIJHAAR, E.; LAM, T.J.G. M.; TAVERNE-THIELE, A.; VAN DER POEL, J. J.; VAN ARENDONK, J. A. M., SAVELKOUL, H. F. J.; PARMENTIER, H. K. Natural antibodies in bovine milk and blood plasma: Variability among cows, repeatability within cows, and relation between milk and plasma titers. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 144, p. 88-94, 2011.

PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 565-578, 2003.

RAINARD, P.; POUTREL, B. Generation of complement fragment C5a in milk is variable among cows. **Journal of Dairy Science,** v.83, n.5, p.945-951, 2000.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research,** v.37, n.3, p.369-400, 2006.

RANTALA, M.; KAARTINEN, L.; VÄ LIMÄKI, E.; STRYRMAN, M.; HIEKKARANT, M.; NIEMI, A.; SAARI, L.; PYÖRÄLÄ, S. Efficacy and pharmacokinetics of enrofloxacin

and flunixin meglumine for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. **Journal Veterinary Pharmacology Therapy,** v**.** 25, p. 251–258, 2002.

REIS, S. R., SILVA, N., BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

SAINI, V.; OLDE RIEKERINK, R. G. M.; MCCLURE, J. T.; BARKEMA, H. W. Diagnostic accuracy assessment of sensititre and agar disk diffusion for determining antimicrobial resistance profiles of bovine clinical mastitis pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n, 4, p. 1568–1577, 2011.

SAKEMI, Y.; TAMURA, Y.; HAGIWARA, K. Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Research**, v. 78 p. 118–121, 2011.

SAKWINSKA, O.; MORISSET, D.; MADEC, J. Y.; WALDVOGEL, A.; MOREILLON, P.; HAENNI, M. Link between Genotype and Antimicrobial Resistance in bovine mastitis - related *Staphylococcus aureus* strains, determined by comparing Swiss and French isolates from the Rhône Valley. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3428-3432, 2011.

SANCHEZ, M. S.; FORD, C. W.; YANCEY, J. R. Effect of tumor necrosis factor-a, interleukin-1b and antibiotics on the killing of intracellular Staphylococcus aureus. **Journal Dairy Science,** v. 77, p. 1251–1258, 1994.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199-207, 1957.

SHEPHARD, R. W.; MALMO, J.; PFEIFFER, D. U. A clinical trial to evaluate the effectiveness of antibiotic treatment of lactating cows with high somatic cell counts in their milk. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 11, p. 763-768, 2000**.**

SHPIGEL, N. Y.; DLEVIN, D.; WINKLER, M.; SARAN, A.; ZIV, G.; BÖTTNER, A. Efficacy of Cefquinome for Treatment of Cows with Mastitis Experimentally Induced Using *Escherichia coli*. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 318–323.

SORDILLO L. M.; STREICHER K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.** v. 2, p. 135-146, 2002.

SORDILLO, L. M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Livestock Production Science,** v. 98, n. 2, p. 88-89, 2005.

SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G.; PENNA, C. F. A. M.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; HEINEMANN, M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe?. **Small Ruminant Research,** v. 107, p. 65– 75, 2012.

SUOJALA , L.; SIMOJOKI , H.; MUSTONEN, K.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastitis. **Journal Dairy Science,** v. 93, p.1960–1969, 2013.

SWINKELS, J. M.; COX, P.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. G. M. Efficacy of extended cefquinome treatment of clinical *Sthaphylococcus aureus* mastitis. **Journal Dairy Science,** v. 96, p. 4983-4992, 2013.

THOMPSON-SNIPES, L.; DHAR, V.; BOND, M.W.; MOS MANN, T. R.; MOORE, K. W.; RENNICK, D. M. Interleukin 10: a novel stimulatory factor mast cells and their progenitors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 507-510, 1991.

VAN KNEGSEL, A. T.; DE VRIES REILINGH, G.; MEULENBERG, S.; VAN DEN BRAND, H.; DIJKSTRA, J.; KEMP, B.; PARMENTIER, H. K.. Natural antibodies

related to energy balance in early lactation dairy cows. **Journal of dairy Science**. v. 90, p. 5490–5498, 2007.

VARELLA, P. P. V.; FORTES, W. C. N. Citocinas: revisão. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia, v. 24, p. 146-154, 2001.

WEAVER, L. D.; GALLAND, J.; MARTIN, P. A. J.; VERSTEEG, J. Treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows: Comparative efficacies of two antibiotic preparations and factors associated with successful treatment. **Journal American Veterinary Medicine Association,** v. 189, p. 666-669, 1986.

WENZ, J. R.; GARRY, F. B.; LOMBARD, J. E.; ELIA, R.; PRENTICE, D.; DINSMORE, R. P. Short communication: Efficacy of parenteral ceftiofur for treatment of systemically mild clinical mastitis in dairy cattle. **Journal of Dairy Science,** v. 88, p. 3496–3499, 2005.

WILSON, C. D. J.; MALLARD, B. A.; BURTON, J. L.; SCHUKKEN, Y. Milk and serum J5 - specific antibody responses, milk production change, and clinical effects following intramammary escherichia coli challenge for J5 vaccinate and control cows. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 693-699, 2007.

WORKU, M.; PAAPE, M. J.; MARQUARDT, M. M. Modulation of Fc receptors for IgG on bovine polymorphonuclear neutrophils by interferon-gamma through RNA transcription and protein synthesis. **American Journal Veterinary Research,** n. 55, v.2, p. 234-238, 1994.

ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; WELLENBERG, G. J.; GRÖHN, Y. T.; SCHUKKEN, Y. H. Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2649–2663, 2001.

ZAFALON, L.F., FILHO, A.N. Relação custo-benefício do tratamento da mastite subclínica causada por *S. aureus*. In: MESQUITA, A.J., DURR, J.W., COELHO, K.O. **Perspectiva e avanços da qualidade do leite no Brasil.** Goiânia: Talento, 2006, v. 1, p. 209-226.