

**ANDRÉ LANG**

**IMUNIDADE PASSIVA EM EQÜINOS NEONATOS: AVALIAÇÃO POR  
DIFERENTES MÉTODOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L269i  
2006 Lang, André, 1977-  
Imunidade passiva em eqüinos neonatos : avaliação por  
diferentes métodos / André Lang. – Viçosa : UFV, 2006.  
iv, 82f. : il. ; 29cm.

Orientador: Maria Verônica de Souza.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Eqüino - Imunologia. 2. Neonatologia. 3. Sorologia -  
Testes. 4. IgG - Imunologia. 5. Colostro. 6. Imunologia  
veterinária. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.10896079

**ANDRÉ LANG**

**IMUNIDADE PASSIVA EM EQUINOS NEONATOS: AVALIAÇÃO  
POR DIFERENTES MÉTODOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 21 de julho de 2006.

---

Prof. Luiz Gonzaga Pompermayer  
(Co-orientador)

---

Prof. José Dantas Ribeiro Filho  
(Co-orientador)

---

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria Verônica de Souza  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela oportunidade da vida;

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional e confiança constantes;

A Tatiana pelo carinho, compreensão e apoio;

A minha orientadora Maria Verônica de Souza, mais do que nunca, pela ajuda, liberdade e paciência;

Aos professores do programa de pós-graduação UFV pelos ensinamentos e exemplos;

Ao professor Giovanni Ribeiro de Carvalho por permitir o uso das instalações e animais para coleta das amostras;

Ao professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo por permitir o uso das instalações e materiais do Laboratório de biologia e controle de hematozoários (LBCH) BIOAGRO/UFV;

Aos funcionários do Hospital Veterinário, Eqüideocultura e LBCH/BIOAGRO/UFV;

Aos colegas Frederico, Reno, Gilberto e Sidimar, pelo auxílio prestado;

A UFV, que possibilitou a realização desse trabalho.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>1. CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	01
1.1. INTRODUÇÃO GERAL	02
1.2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL	03
1.2.1. Produção e absorção de imunoglobulinas pelo neonato	03
1.2.2. Transferência de imunidade passiva	04
1.2.3. Causas da falha na transferência de imunidade passiva	07
1.2.4. Métodos de avaliação da concentração da imunoglobulina G	09
1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
<b>2. CAPÍTULO 2. TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM EQÜINOS: COMPARAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G DO SORO MATERNO, COLOSTRO E SORO DO NEONATO</b>	18
2.1. RESUMO	19
2.2. ABSTRACT	20
2.3. INTRODUÇÃO	21
2.4. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.4.1. Coleta das amostras	27
2.4.2. Imunodifusão radial simples (IDRS)	28

2.4.3. Análise estatística	29
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
2.6. CONCLUSÕES	35
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
<b>3. CAPÍTULO 3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G NO SORO DE NEONATOS EQUINOS: COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES E TURBIDEZ PELO SULFATO DE ZINCO</b>	40
3.1. RESUMO	41
3.2. ABSTRACT	42
3.3. INTRODUÇÃO	43
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.4.1. Coleta das amostras	48
3.4.2. Imunodifusão radial simples (IDRS)	49
3.4.3. Turbidez pelo sulfato de zinco (TSZ)	49
3.4.4. Análise estatística	50
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.6. CONCLUSÕES	56
3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
<b>4. CAPÍTULO 4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G NO SORO DE NEONATOS EQUINOS PELOS MÉTODOS DE IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES E COAGULAÇÃO PELO GLUTARALDEÍDO</b>	61
4.1. RESUMO	62
4.2. ABSTRACT	63
4.3. INTRODUÇÃO	64
4.4. MATERIAL E MÉTODOS	69
4.4.1. Coleta das amostras	69
4.4.2. Imunodifusão radial simples (IDRS)	70
4.4.3. Coagulação pelo glutaraldeído (CG)	71
4.4.4. Análise estatística	71

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.6. CONCLUSÕES	77
4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>82</b>

## RESUMO

LANG, André, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2006. **“Imunidade passiva em eqüinos neonatos: avaliação por diferentes métodos”**. Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-Orientadores: José Dantas Ribeiro Filho e Luiz Gonzaga Pompermeyer.

O objetivo deste estudo foi avaliar a transferência de imunidade passiva em neonatos eqüinos, mediante a utilização do método de imunodifusão radial simples (IDRS) e verificar a correlação entre a concentração de IgG no soro materno, no colostro e no soro do neonato, bem como comparar os resultados obtidos com esta metodologia com aqueles alcançados pelas técnicas de turbidez pelo sulfato de zinco (TSZ) e coagulação pelo glutaraldeído (CG). Para isso foram utilizados 34 animais, sendo 17 éguas e respectivos neonatos, mestiços da raça Bretão. Os partos foram acompanhados e amostras de colostro foram coletadas imediatamente após o parto, assim como com 12 e 48 horas após o mesmo. Amostras de sangue foram coletadas das éguas próximo ao parto e dos potros imediatamente após o nascimento, antes da ingestão de colostro, e com 6, 12, 24, 48 horas e 30 dias após o mesmo. As amostras foram processadas e a concentração de IgG no colostro determinada por IDRS. As amostras de soro foram submetidas às técnicas de IDRS, TSZ e CG. Observou-se queda na concentração de anticorpos no colostro após o parto, porém valores ainda significativos foram detectados com 48 horas. Não foi observado correlação significativa entre a concentração de IgG no soro das éguas e respectivo colostro, mas sim entre a concentração no soro das éguas e soro dos neonatos, no momento em que cada animal apresentou valor máximo dessa imunoglobulina, o que ocorreu entre 6 e 24 horas após o parto. Correlação também foi encontrada entre as concentrações de IgG no

colostro e soro dos neonatos no momento do parto, assim como com 12 e 48 horas após o mesmo. Valores máximos de IgG foram encontrados com 48 horas após o parto, tanto quando se utilizou a técnica de IDRS como TSZ ou CG. A comparação dos valores médios de IgG obtidos em cada tempo, mostrou o momento de 12 horas após o parto como indicado para a determinação da concentração de IgG para os métodos de IDRS e TSZ e 6 horas indicado para CG. Correlação significativa foi observada entre a concentração de IgG no soro determinada por IDRS e a encontrada por TSZ e CG.

## ABSTRACT

LANG, André, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2006. **“Passive immunity in equine neonates: evaluation by different methods”**. Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-Advisers: José Dantas Ribeiro Filho and Luiz Gonzaga Pompermeyer.

The objective of this study was to evaluate passive transfer of immunity in newborn foals, by applying the single radial immunodiffusion (SRID) method and to verify immunoglobulin G correlation in the maternal serum, colostrum, and neonatal serum, as well as compare the results from this methodology with those from zinc sulfate turbidity (ZST) and gluteraldehyde coagulation (GC). Thus, 34 Breton cross bred animals were used, 17 mares and respective neonates, mixed Breton breed. The births were monitored and colostrum samples were collected immediately and 12 and 48 hours after birth. Blood samples were collected from the mares next to the foals' birth and from the foals immediately, before colostrums ingestion, and 6, 12, 24, 48 hours and 30 days after birth. The samples were processed and IgG concentration determined in the colostrum by SRID. Blood serum samples was used for SRID, TSZ and GC. A drop in antibody concentration in the colostrum was observed after birth, however still significant values were detected within 48 hours. No significant correlation was verified between mare serum IgG concentration and respective colostrum concentration, but rather between mare serum and neonate serum concentrations, at the moment that each animal presented maximum value of this immunoglobulin, which occurred between 6 and 24 hours after birth. Correlation was also found between IgG concentration in the colostrum and neonatal serum at birth, and 12 and 48 hours after it. Maximum IgG values were found 48 hours after birth, for SRID, ZST and GC test. The comparison of the mean IgG values obtained each time indicated a period of 12 hours

after birth as the ideal time for determining IgG concentration by the SRID and ZST techniques and of 6 hours using the GC test. A significant correlation was observed between IgG concentration obtained in the foal serum by the SRID technique with that found using ZST and GC test.

## **CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

**LANG, André; Universidade Federal de Viçosa.**

## **1.1. INTRODUÇÃO GERAL**

O alto risco de infecções em mamíferos neonatos é descrito e reconhecido em todas as espécies. Em eqüinos, o tipo de placenta funciona como uma barreira à passagem de anticorpos para os fetos durante a gestação, e a transferência de imunidade passiva é dependente da ingestão e absorção do colostro.

O fato de neonatos eqüinos, com falha na transferência de imunidade passiva (FTP) ou falha parcial na transferência de imunidade passiva (FPTP), apresentarem maior morbidade e mortalidade por doenças infecciosas como diarreia, pneumonia, artrite e septicemia, torna a adoção de métodos para determinação do estado imunológico importante para maior retorno dos investimentos realizados na criação da espécie. O parâmetro mais utilizado para a verificação deste estado imunológico é a concentração da imunoglobulina G (IgG) no soro do neonato. Entretanto, é preciso que os testes utilizados apresentem resultados em pouco tempo, sejam de fácil realização, confiáveis, e de baixo custo para sua aplicação em situações práticas.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a transferência de imunidade passiva na espécie eqüina, mediante a determinação da concentração de imunoglobulina G, comparando diferentes métodos.

## **1.2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL**

### **1.2.1. Produção e absorção de imunoglobulinas pelo neonato**

#### ***A placenta***

A placenta do tipo epiteliocorial difusa da égua apresenta seis camadas teciduais entre a circulação sangüínea materna e fetal, compreendendo o endotélio capilar materno, tecido conjuntivo uterino, epitélio uterino, epitélio coriônico, tecido conjuntivo fetal e endotélio capilar fetal, que promovem uma barreira para a transferência transplacentária de anticorpos. Por esta razão, os potros nascem hipo ou agamaglobulinêmicos (Jeffcott, 1974; Tizard, 1985; Koterba et al., 1990; Feitosa et al., 2001).

#### ***O colostro***

O colostro é a primeira secreção láctea por ocasião do parto, constituído de leite e elementos do soro sangüíneo como as imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G (Tizard, 1985; Parish, 1996). O mecanismo seletivo pelo qual ocorre a transferência de IgG do sangue para a glândula mamária envolve um conjunto de fatores como receptores na membrana basal ou intercelular da célula acinar epitelial e controle hormonal na síntese e transporte de imunoglobulinas (Pauletti, 1999; Bessi, 2001).

As imunoglobulinas ativam a cascata de complemento pela via clássica, e se aderem à superfície de antígenos para fagocitose por macrófagos, granulócitos, linfócitos ou células “Natural Killers” (Paul, 1993).

A secreção de colostro é breve e normalmente os níveis de anticorpos tornam-se insignificantes em 24 horas (Jeffcott, 1974; Koterba et al., 1990; Blood & Radostitis, 1991). O potro deve ingerir colostro nas primeiras 2 horas de vida e em torno de 6 horas imunoglobulinas podem ser encontradas no soro, atingindo pico em 18 horas, em concentração muito próxima à encontrada no soro materno (Jeffcott, 1974; Koterba et al., 1990).

### ***A absorção intestinal***

Os anticorpos presentes no colostro são absorvidos pelo processo de pinocitose por células epiteliais do intestino delgado, principalmente no jejuno e íleo, que são substituídas em até 36 horas. Estas macromoléculas são carregadas para o tecido linfóide local, sendo posteriormente drenadas para a circulação sistêmica via ducto torácico, garantindo imunidade inata (Elliott & Wagner, 1984; Raidal et al., 2000; Bessi, 2001; Riddle, 2003).

Dois fatores importantes que determinam a quantidade de IgG absorvida são o tempo entre o parto e a primeira ingestão do colostro e a concentração dessa imunoglobulina no mesmo (Susin, 1985; Pauletti, 1999).

### **1.2.2. Transferência de imunidade passiva**

A concentração mínima de IgG necessária para proteção do potro contra infecções depende de fatores inerentes aos patógenos presentes no meio ambiente, fatores relacionados ao manejo e ao estresse (McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979; Koterba et al., 1990; Feitosa, 1999).

Índices de mortalidade podem atingir 10-12% em espécies uníparas, principalmente em casos de predação e quando não há manejo adequado (Mellor & Stafford, 2004). A incidência de falha na transferência de imunidade passiva tem sido estimada em 2,9 a 25%, sendo dependente do desafio ao qual o neonato está exposto (McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979).

Segundo Tizard (1985), os níveis séricos de imunoglobulinas em equinos adultos hígdos são de 500 a 2.000 mg/dL de IgG, 80 a 200 mg/dL de IgM, 60 a 350 mg/dL de IgA e 100 a 1.500 mg/dL de IgGt.

Diversos estudos demonstram que potros com falha total na transferência de imunidade passiva têm concentração sérica de IgG inferior a 200 mg/dL, já quando a falha

é parcial, os valores podem variar entre 200 a 400 mg/dL, sendo considerado aceitável, acima de 800 mg/dL (Rumbaugh et al., 1979; Parish, 1996; Mellor & Stafford, 2004).

Existe relação inversamente proporcional entre níveis séricos de IgG e infecções neonatais, havendo uma incidência de infecção e mortalidade significativamente maior em potros com níveis séricos de IgG inferiores a 400 mg/dL (McGuire et al., 1975; Riddle, 2003).

A FTP é, provavelmente, o fator predisponente mais comum de infecção em potros com até duas semanas de vida, sendo sua incidência dependente de aspectos que certifiquem uma adequada ingestão e absorção do colostro (McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979; Parish, 1996; Mellor & Stafford, 2004).

Um estudo realizado por Raidal (1996), para a determinação da concentração de IgG em 323 potros neonatos, utilizando o método de imunodifusão radial simples (IDRS), revelou que 1,9% (N=6) dos animais apresentaram concentrações de IgG < 400 mg/dL, 5% (N=16) IgG ≤ 400 mg/dL e 9,6% (N=31) IgG < 800 mg/dL. Níveis de IgG < 800 mg/dL nas primeiras 24 horas de vida estiveram associados de forma significativa a um aumento na incidência de doenças infecciosas perinatais.

Uma pesquisa realizada por McGuire et al. (1977) em 62 potros provenientes de um mesmo criatório, com a finalidade de determinar a concentração de IgG no soro pela técnica de imunodifusão radial simples demonstrou que 6 animais (9,7%) apresentavam menos de 200 mg/dL de IgG, mesmo após ingerirem colostro por mais de 24 horas. Quatro dos seis potros apresentaram problemas durante as primeiras duas semanas de vida, incluindo diarreia, pneumonia e infecção do trato respiratório superior. A falha na transferência de imunidade passiva foi atribuída à incapacidade de ingestão do colostro pelo potro (N=1), apesar da assistência realizada nas primeiras 24 horas, assim como pela baixa concentração de IgG (N=2) no leite materno. Em três animais, a causa não foi determinada. Em outra propriedade, 12% de 25 neonatos apresentaram concentração de IgG menor que 200 mg/dL e todos manifestaram diarreia e/ou pneumonia. Segundo os autores, falha parcial ocorreu em 16,1% na primeira propriedade, e apenas dois animais manifestaram quadro de infecção discreta, sendo um após 60 dias. Na segunda propriedade a falha parcial atingiu dois animais dos quais um desenvolveu artrite e posteriormente veio a óbito. Dos potros com transferência adequada de imunidade passiva, 74,2% na primeira propriedade e 80% na segunda, não apresentaram quadro de infecção.

Townsend et al. (1983) utilizaram prostaglandina sintética na dose de 10 mg via intramuscular para indução de parto, e determinaram por imunodifusão radial simples, a concentração de IgG no soro dos potros neonatos. Os autores constataram concentrações de IgG inferiores às das éguas, tanto no grupo tratado como no controle. A concentração média de IgG no colostro das éguas tratadas foi de 6.438 mg/dL, variando de 3.600 a 10.250 mg/dL, excedendo assim, o valor mínimo recomendado que é de 1.000 mg/dL de IgG. Como não houve caso de lactação prematura ou atraso na ingestão do colostro, foi cogitada a hipótese de produção inadequada de colostro como a causa da redução dos níveis de IgG no soro dos neonatos.

Conforme resultados encontrados por Morris et al. (1985), mediante a utilização de imunodifusão radial simples, em amostras de soro de equinos coletadas entre 24 e 36 horas após o nascimento, a concentração de IgG variou entre 112 a 2.948 mg/dL e, apenas 2,9% (4 de 136 amostras), desenvolveram falha na transferência de imunidade passiva. Das quatro éguas que tiveram potros com falha na imunidade passiva, 50% apresentaram lactação prematura. Correlação positiva ( $r=0,58$ ;  $p<0,001$ ) foi observada entre a concentração de IgG no colostro e soro dos potros. Concentração inferior a 1.000 mg/dL foi observada no colostro de duas éguas que apresentaram lactação prematura e seus potros apresentaram concentração de IgG inferior a 500 mg/dL. Os autores encontraram ainda significativa relação entre os testes de imunodifusão radial simples, turbidez por sulfato de zinco e aglutinação em látex.

Clabough et al. (1991), determinaram a concentração de IgG no soro de 361 neonatos 24 a 36 horas após o parto, utilizando o teste de coagulação por glutaraldeído e encontraram uma prevalência de 18% (N=65) de FTP. Os autores consideraram falha na transferência passiva, quando a concentração de IgG foi inferior a 400 mg/dL. Dos 65 potros com FTP, 35,4% precisaram de assistência clínica até os três meses de idade. Fatores como idade das éguas, número de partos, retenção e peso da placenta, tempo de gestação, ocorrência de distorcia e a época do ano em que os potros nasceram foram avaliadas com a finalidade de determinar predisposição à falha na transferência passiva. A exceção da época em que ocorreram os partos (quando houve menos casos de FTP no final do inverno, sendo considerado fisiológico devido à época de cobertura das éguas), não houve associação entre FTP e os aspectos avaliados. Os potros com FTP apresentaram menor desenvolvimento com relação a idade gestacional, deformidades do esqueleto apendicular e vigor reduzido.

Stoneham et al. (1991), determinaram durante três anos consecutivos (1988, 1989 e 1990), a concentração de IgG no soro de 1922 potros com 12 a 72 horas de vida, mediante a avaliação da concentração da proteína total, subtraindo-se a concentração de albumina (método de bromocresol). A prevalência de FTP e FFTP foi de 15%, ocorrendo redução significativa na incidência dessa condição no ano de 1990, devido as melhorias realizadas no que se refere ao manejo adotado na propriedade, o que resultou na queda de 6% para 2% na ocorrência de FTP e em 22% para 11% na quantidade de animais com IgG entre 400 e 800 mg/dL. As afecções diagnosticadas nos potros com IgG < 400 mg/dL foram artrite, poliartrite, além de atraso no desenvolvimento; já nos potros com IgG > 400 mg/dL, porém abaixo de 800 mg/dL foram observados onfaloflebite, abscessos subcutâneos (no tórax), pneumonia, distúrbios gastrointestinais, septicemia, infecção do trato respiratório superior, bronquiolite, piroxia e leucocitose de origem desconhecida, além de atraso no desenvolvimento.

Buscando aumentar a imunidade do neonato, Chaffin & Cohen (1998), utilizaram antisoro comercial para *Escherichia coli*. Entretanto, os autores não encontraram diferença significativa entre o grupo tratado e o controle quanto à concentração sérica de IgG determinada por imunodifusão radial simples, sendo verificada uma média de 1.600 mg/dL de concentração dessa imunoglobulina em ambos os grupos. Dos 137 animais do grupo tratado, 12 (8,8%) apresentaram FFTP e 6 (4,4%) FTP; já no grupo controle, dos 131 animais avaliados, 8 (6,1%) apresentaram FFTP e 3 (2,3%) FTP. De 61 potros que adoeceram, 48 tiveram doença infecciosa (infecção do trato respiratório superior, gastrointestinal e/ou urogenital, artrite séptica, quadro dermatológico e septicemia), que não diferiram entre os grupos. Doenças não infecciosas também foram relatadas, como deformidade músculo-esquelética congênita, afecção músculo-esquelética traumática, ulceração gástrica, persistência do úraco, doença neurológica, além de outros quadros sem diagnóstico definitivo.

### **1.2.3. Causas da falha na transferência de imunidade passiva**

#### ***Falha na produção de colostro***

Condição rara que pode acometer fêmeas primíparas, possivelmente por simples déficit no mecanismo de seleção de imunoglobulinas do sangue para concentração na

glândula mamária. Esta etiologia na falha de produção de colostro é bem estudada na espécie bovina (Elliott & Wagner, 1984).

### ***Lactação prematura***

Lactação prévia ao parto é relativamente comum, sendo uma importante causa de baixa imunidade em potros da raça Puro-Sangue Inglês (Rossdale, 1967). A secreção prematura, por mais de 24 horas, reduz consideravelmente a concentração de anticorpos disponíveis ao neonato (LeBlanc & Tran, 1987; Clabough et al., 1991).

### ***Atraso na ingestão de colostro***

Potros que demoram 24 horas ou mais para ingerir colostro têm sua absorção intestinal comprometida ou ausente, permanecendo hipo ou agamaglobulinêmicos (Kruse, 1970; Jeffcott, 1974; McGuire et al., 1977). Este fato ocorre quando a égua não permite que o potro mame ou por fraqueza do mesmo.

### ***Estresse e má-absorção intestinal***

Em condições de estresse, maiores quantidades de corticosteróides podem ser produzidas pela glândula adrenal materna ou do neonato, sendo capaz de afetar a absorção intestinal de anticorpos (Stoneham et al., 1991). Por outro lado, Carrick et al. (1987), verificando a influência da administração de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na concentração de IgG no soro de potros, não encontraram diferença significativa entre grupo tratado e grupo controle. Segundo os autores, maiores níveis de cortisol não interferem diretamente na absorção de IgG pelo neonato equino, mas que fatores como estresse térmico resultam em fraqueza muscular e relutância em se manter em estação e, conseqüentemente, falha na amamentação, o que contribui para menor ingestão do colostro. Na opinião de Clabough et al. (1991), o estresse térmico, principalmente o calor, pode ter maior influência que o cortisol, por levar a um estado letárgico e diminuir a capacidade de mamar dos potros neonatos.

### ***Prematuridade e indução do parto***

Éguas que vêm a parir antes de 320 dias de gestação podem ter o mecanismo fisiológico de seleção de imunoglobulina prejudicado e não produzir colostro em

quantidade adequada, o que pode originar potros com menor concentração sérica de imunoglobulinas (Townsend et al., 1983).

#### **1.2.4. Métodos de avaliação da concentração da imunoglobulina G**

Um colostro de boa qualidade, ou seja, com altas concentrações de imunoglobulinas tem alta viscosidade e coloração mais amarelada e escura que o leite (Koterba et al., 1990). Porém estes critérios subjetivos podem induzir a erros durante a avaliação da qualidade do colostro, sendo indicado o exame de gravidade específica ou uso de técnicas diretas como imunodifusão radial simples ou métodos imunoenzimáticos como o ELISA.

Além da concentração de IgG no colostro é importante determinar a concentração de IgG no soro sangüíneo. Os métodos disponíveis para avaliação dos níveis séricos de imunoglobulinas podem ser indiretos ou diretos.

#### **Métodos indiretos**

##### ***Refratometria***

Este método se baseia no fato de que o aumento nas proteínas totais reflete transferência de imunoglobulina, por se tratar de uma única classe de proteínas séricas que aumenta marcadamente após ingestão e absorção do colostro. A estimativa da concentração imunoglobulina sérica pós-ingestão do colostro é feita subtraindo-se o valor de 4,3 g/dL, que representa a concentração protéica sérica total pré-ingestão. Como esta medida pré-ingestão apresenta variação individual, os valores estimados podem não corresponder exatamente à realidade (Rumbaugh et al., 1979; Kaneko, 1989; Stoneham et al., 1991).

##### ***Turbidez pelo sulfato de zinco (TSZ)***

Este teste depende da formação de sais precipitados pela combinação química de globulinas de alto peso molecular com íons metálicos. A turbidez do soro sangüíneo do neonato pode ser medida pela absorção ou redução da transmissão de luz por espectrofotometria (teste quantitativo), ou estimada visualmente (teste qualitativo) e comparado ao teste realizado com o soro materno (Pfeiffer et al., 1977; Koterba et al., 1990; Raidal, 1996; McGowan et al., 1997).

### ***Coagulação por glutaraldeído (CG)***

O glutaraldeído em solução a 10% é capaz de coagular as imunoglobulinas séricas quando estas se encontram em concentrações superiores a 600 mg/dL, em diferentes períodos de tempo (Clabough et al., 1991; Parish, 1996). Segundo McGowan et al. (1997), quando aparecem coágulos em menos de 10 minutos, se considera que houve transferência normal de imunoglobulinas; quando entre 10 e 60 minutos, a falha é parcial e quando superior a 60 minutos, há realmente falha na transferência de imunidade passiva.

### ***Aglutinação no látex***

Este método baseia-se na observação de aglutinação em apenas dez minutos, quando partículas de látex são misturadas com soro ou sangue. (Koterba et al., 1990). Em estudo realizado por Elliott e Wagner (1984), os autores recomendaram o teste com sangue total para triagem das falhas parciais (menos de 400 mg/dL), e soro para verificação de falha parcial ou total na transferência de IgG.

## **Métodos diretos**

### ***Eletroforese***

Interpretado pela diferente migração das proteínas séricas em papel, provocada por campo elétrico. Parte do princípio que toda imunoglobulina migra na fração  $\gamma$ -globulina, mas outras técnicas de separação têm mostrado que as imunoglobulinas não estão totalmente confinadas à fração  $\gamma$ -globulina do soro e a interpretação direta desses resultados pode não ser a correta (Pfeiffer et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979; Kaneko, 1989), sendo assim fundamental a comparação com outros métodos.

### ***Imunodifusão radial simples (IDRS)***

Esta mensuração quantitativa é baseada no teste de anti-soro específico contido em matriz de gel reagindo com o soro do paciente. O tamanho dos anéis de precipitação produzidos pela difusão do soro testado é comparado com padrões conhecidos, dando informação de classe e subclasse de imunoglobulina específica (Mancini et al., 1965; Rumbaugh et al., 1979). Apesar de ser considerado o teste de escolha para a determinação de FTP, a não disposição imediata dos resultados, o alto custo e a dependência de

equipamentos limitam a aplicação desta técnica (Fahhey & Kelvey, 1965; Pfeiffer et al., 1977; Kaneko, 1989; Feitosa et al., 2001).

### ***Elisa***

Técnica imunoenzimática que emprega imunoglobulinas marcadas com enzimas. Há formação de um composto colorido gerado pela ação da enzima, geralmente peroxidase ou fosfatase, sobre substrato adequado. O teste imunoenzimático ou tecnologia do imunoenensaio de concentração (CITE) são exames que requerem anticorpos e reagentes específicos, tempo, equipamentos e habilidade laboratorial, representando alto custo para aplicação a campo (Filho et al., 1998).

Um método que produz alguns resultados falso-positivos tem maior especificidade, já quando produz alguns resultados falso-negativos tem maior sensibilidade. O ideal é que a técnica tenha alta sensibilidade e especificidade, como é o caso da imunodifusão radial simples. Infelizmente esta técnica leva de 18 a 24 horas para apresentar os resultados, além de exigir maiores recursos laboratoriais. Em contraste, existem testes mais simples e rápidos. Nesse sentido, o ideal é que ele possua maior sensibilidade para minimizar as falhas na classificação de potros imunodeficientes. Sendo assim, o teste de coagulação por glutaraldeído é tido como de sensibilidade relativamente alta, entretanto deve ser utilizado em conjunto com um segundo teste confirmatório (McClure et al., 2003).

Uma vez realizada a avaliação precoce do estado imunológico do neonato e diagnosticada FTP, medidas importantes devem ser tomadas para aumentar a quantidade de anticorpos até concentrações adequadas em tempo hábil, como administração de colostro ou plasma (materno ou de outra égua), IgG liofilizada via oral ou transfusão de plasma de um doador imunocompetente, de preferência criada no mesmo ambiente (Koterba et al., 1990; Wilkins & Dewan, 1994, McGowan et al, 1997; Pierce, 2003; Riddle, 2003). No potro doente, a avaliação deste estado imunológico deve ser feita com freqüência. (Wilkins & Dewan, 1994).

A determinação da concentração de IgG tem importância também na realização de seguro de vida dos potros. Algumas companhias de seguro aceitam níveis de 400 mg/dL, enquanto outras exigem concentrações superiores a 800 mg/dL. Se os níveis de 800 mg/dL não forem atingidos pela administração intravenosa de plasma, deverão de alcançados pelo

fornecimento via oral, devido ao aumento do risco de reações anafiláticas quando são fornecidas repetidas transfusões de plasma. Por outro lado, o tempo limitado de absorção via oral aumenta a importância da determinação precoce da concentração de IgG sérica (Pierce, 2003).

### 1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESSI, R. **Estudo da absorção de anticorpos do colostro em bezerros recém-nascidos.** Piracicaba: ESALQ/USP, 2001. Dissertação (doutorado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 2001. 58p.

BLOOD, D.C., RADOSTITIS, O.M. Doenças do recém-nascido. In: BLOOD, D.C., RADOSTITIS, O.M. (Eds). **Clínica Veterinária**, 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap.3, p.81-104.

CARRICK, J.B.; POLLITT, C.C.; THOMPSON, H.L. et al. Failure of the administration of ACTH to affect the absorption of colostral immunoglobulins in neonatal foal. **Equine Veterinary Journal**, v.19, n.6, p.545-547, 1987.

CHAFFIN, M.K., COHEN, N.D. Randomized controlled trial of effects of *Escherichia coli* antiserum on serum immunoglobulin G concentrations and morbidity and mortality rates in foals **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.212, n.11, p.1746-1750, 1998.

CLABOUGH D.L.; LEVINE J.F.; GRANT G.L. et al. Factors associated with failure of passive transfer of colostral antibodies in standardbred foals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.5, n.6, p.335-340, 1991.

ELLIOTT, K.K.; WAGNER, P.C. Failure of passive antibody transfer in the foal. **The Compendium on Continued Education**, v.6, n.12, p.5702-5706, 1984.

FAHHEY, J.L.; McKELVEY, E.M. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. **Journal of Immunology**, v.94, p.84-90, 1965.

FEITOSA, F.L.F. Importância da transferência da imunidade passiva para a sobrevivência de bezerros neonatos. **Revista de Educação Continuada - CRMV-SP**, v.2, n.3, p.17-22, 1999.

FEITOSA, F.L.F., BIRGEL, E.H., MIRANDOLA, R.M.S. et al. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gama glutamil transferase no soro sanguíneo. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.251-255, 2001.

FILHO, G.B.; BARBOSA, A.J.A.; MIRANDA, D. **Métodos de estudo em patologia**. In: FILHO, G.B. (Ed.). *Patologia Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap. 2, p. 6-18.

JEFFCOT, L.B. Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. **Equine Veterinary Journal**, v.6, n.3, p.109-115, 1974.

KANEKO, II. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 4<sup>th</sup> ed. London: Academic Press Inc., 1989. 932p.

KOTERBA, A.M.; DRUMOND, W.H.; KOSCH, P.C. **Equine clinical neonatology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. 846p.

LeBLANC, M.M.; TRAN, T.Q. Relationships among colostrum electrolytes, colostrum IgG concentrations and absorption of colostrum IgG by foals. **Journal of Reproduction Fertility**, n.35, v.735, p.619-622, 1987.

MANCINI, G., CARBONARA, A.O., HEREMANS, J.F. Imunochemical quantitation of antigens by single radial immunodifusion. **Imunochemistry**, v.2, n.3, p.235-254, 1965.

McCLURE, J.T.; MILLER, J.; DeLUCA, J.L. **Comparison of two ELISA screening tests and a non-commercial glutaraldehyde coagulation screening test for the detection of failure of passive transfer in neonatal foals**, 2003. Capturado em 25 de outubro de 2004. Online. Disponível na Internet: <http://www.ivis.org>.

McGOWAN, C.M.T.; HODGSON, J.L.; HODGSON, D.R. Failure of passive transfer in foals: incidence and outcome on four studs in new south wales. **Australian Veterinary Journal**, v.75, n.1, p.56-59, 1997.

McGUIRE, T.C.; CRAWFORD, T.B.; HALLOWELL, A.L. et al. Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.170, n.11, p.1302-1304, 1977.

McGUIRE, T.C.; POPPIE, M.J.; BANKS, K.L. Hypogammaglobulinemia predisposing to infections in foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.166, n.71, p.1138-1140, 1975.

MELLOR, D.J.; STAFFORD, K.J. Animal welfare implications of neonatal mortality and morbidity in farm animals. **The Veterinary Journal**, v.168, n.15, p.118-133, 2004.

MORRIS, D.D.; MEIRS, D.A.; MERRYMAN, G.S. Passive transfer failure in horses: incidence and causative factors on a breeding farm. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.11, p.2294-2297, 1985.

PARISH, S.M. Ruminant immunodeficiency diseases. In: SMITH, B.P. (Ed.). **Large animal internal medicine**. 2<sup>nd</sup> ed. St.Louis: Mosby, 1996. p.1857-1860.

PAUL, W.E. **Fundamental immunology**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Raven Press, 1993. 1490p.

PAULETTI, P. **Efeito de diferentes níveis iniciais de imunoglobulinas adquiridas do colostro sobre a flutuação de proteínas séricas e desempenho de bezerras da raça holandesa.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 1999. 104p.

PFEIFFER, N.E., McGUIRE, T.C., BENDEL, R.B. Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.5, p.693-698, 1977.

PIERCE, S.W. **Foal care from birth to 30 days: a practitioner's perspective.** In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 49, 2003. Capturado em 26 de outubro de 2004. Online. Disponível na Internet: [www.ivis.org](http://www.ivis.org).

RAIDAL, S.L. The incidence and consequences of failure of passive transfer of immunity on a Thoroughbred breeding farm. **Australian Veterinary Journal**, v.73, n.6, p.201-206, 1996.

RAIDAL, S.L.; MC TAGGART, C.; YOVICH, J.V. et al. Effect of withholding macromolecules on the duration of intestinal permeability to colostral IgG in foals. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 46, 2000. **Proceedings...**, American Association of Equine Practitioners, 2000. p.263.

RIDDLE, W.T. **Preparation of the mare for normal parturition.** In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 49, 2003. Capturado em 26 de outubro de 2004. Online. Disponível na Internet: [www.ivis.org](http://www.ivis.org).

ROSSDALE, P.D. Clinical studies on the newborn thoroughbred foal. 1: Perinatal behaviour. **British Veterinary Journal**. v.123, n.11, p.470-481, 1967.

RUMBAUGH, G.E.; ARDANS, A.A.; GINNO, D. et al. Identification and treatment of colostrum-deficient foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.174, n.3, p.273-276, 1979.

STONEHAM, S.J.; DIGBY, N.J.W.; RICKETTS, S.W. Failure of passive transfer of colostral immunity in the foal: incidence, and the effect of stud management and plasma transfusion. **The Veterinary Record**, v.128, p.416-419, 1991.

SUSIN, I. **Concentrações séricas de proteína total e imunoglobulinas, e desempenho de bezerros submetidos a diferentes regimes de aleitamento e épocas de desmame.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1985. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 1985. 89p.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária**, 2 ed. São Paulo: Roca, 1985. 329p.

TOWNSEND, H.G.G.; TABEL, H.; BRISTOL, F.M. Induction of parturition in mares: effecton passive transfer of immunity to foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.182, n.3, p.255-257, 1983.

WILKINS, P.A., DEWAN-MIX, S. Efficacy of intravenous plasma to transfer passive immunity in clinically healthy and clinically ill equine neonates with failure of passive transfer. **Cornell Veterinary**, v.84, n.1, p.7-14, 1994.

**CAPÍTULO 2. IMUNIDADE PASSIVA EM EQÜINOS: COMPARAÇÃO ENTRE A  
CONCENTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G DO SORO MATERNO,  
COLOSTRO E SORO DO NEONATO**

**LANG, André; Universidade Federal de Viçosa.**

## 2.1. RESUMO

LANG, André, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2006. **“Imunidade passiva em eqüinos: comparação entre a concentração de imunoglobulina G do soro materno, colostro e soro do neonato”**. Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-Orientadores: José Dantas Ribeiro Filho e Luiz Gonzaga Pompermeyer.

O objetivo deste estudo foi determinar a transferência de imunidade passiva em neonatos eqüinos, mediante a utilização do método de imunodifusão radial simples (IDRS) e verificar a correlação entre a concentração de IgG no soro materno, no colostro e no soro do neonato. Para isso foram utilizados 34 animais, sendo 17 éguas e 17 neonatos, mestiços da raça Bretão. Os partos foram acompanhados e amostras de colostro foram coletadas imediatamente após o parto, assim como com 12 e 48 horas após o mesmo. Amostras de sangue foram coletadas das éguas próximo ao parto e dos potros imediatamente após o nascimento e com 6, 12, 24, 48 horas e 30 dias após o mesmo. As amostras foram processadas e a concentração de IgG determinada por IDRS. Observou-se queda na concentração de anticorpos no colostro após o parto, porém valores ainda significativos foram detectados com 48 horas. Não foi observado correlação significativa entre a concentração de IgG no soro das éguas e respectivo colostro, mas sim entre a concentração no soro das éguas e soro dos neonatos, no momento em que cada animal apresentou valor máximo dessa imunoglobulina, o que ocorreu entre 6 e 24 horas após o parto. Correlação também foi encontrada entre as concentrações de IgG no colostro e soro dos neonatos no momento do parto, assim como com 12 e 48 horas após o mesmo.

**Palavras-chave:** Eqüino, imunidade passiva, IgG, colostro.

## 2.2. ABSTRACT

LANG, André, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2006. **“Passive immunity in equine: a comparison of immunoglobulin G concentration in maternal serum, colostrum and neonatal serum”**. Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-Advisers: José Dantas Ribeiro Filho and Luiz Gonzaga Pompermeyer.

The objective of this study was to determine passive transfer of immunity in newborn foals, by applying the single radial immunodiffusion (SRID) method and to verify immunoglobulin G correlation in the maternal serum, colostrum, and neonatal serum. Thus, 34 Breton cross bred animals were used, 17 mares and 17 neonates. The births were monitored and colostrum samples were collected immediately and 12 and 48 h after birth. Blood samples were collected from the mares next to the foals' birth and from the foals immediately and 6, 12, 24, 48 h and 30 days after birth. The samples were processed and IgG concentration determined in the serum by SRID. A drop in antibody concentration in the colostrum was observed after birth, however still significant values were detected within 48 h. No significant correlation was verified between mare serum IgG concentration and respective colostral concentration, but rather between mare serum and neonate serum concentrations, at the moment that each animal presented maximum value of this immunoglobulin, which occurred between 6 and 24 h after birth. Correlation was also found between IgG concentration in the colostral and neonatal serum at birth, and 12 and 48 h after it.

**Key-words:** Equine, passive immunity, IgG, colostrum.

### 2.3. INTRODUÇÃO

Os eqüinos neonatos nascem hipo ou agamaglobulinêmicos devido ao tipo de placenta da espécie, que oferece uma barreira à passagem de anticorpos para os fetos durante a gestação. Nesse sentido, a transferência de imunidade passiva é dependente da ingestão e absorção de colostro.

Os potros com falha total ou parcial na transferência de imunidade passiva são mais freqüentemente acometidos por doenças infecciosas como diarreia, pneumonia, artrite e septicemia, podendo vir a óbito principalmente nas duas primeiras semanas de vida. Este prejuízo à eqüideocultura torna a adoção de métodos para determinação do estado imunológico importante. O parâmetro mais utilizado para a verificação deste estado imunológico é a concentração de imunoglobulina G no soro do neonato.

A placenta do tipo epiteliocorial difusa da égua apresenta seis camadas teciduais entre a circulação sangüínea materna e fetal, compreendendo o endotélio capilar materno, tecido conjuntivo uterino, epitélio uterino, epitélio coriônico, tecido conjuntivo fetal e endotélio capilar fetal, que promovem uma barreira para a transferência transplacentária de anticorpos. Por esta razão os potros nascem hipo ou agamaglobulinêmicos (Jeffcott, 1974; Tizard, 1985; Koterba et al., 1990; Feitosa et al., 2001).

O colostro é a primeira secreção láctea por ocasião do parto, constituído de leite e elementos do soro sangüíneo como as imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G (Tizard, 1985). O mecanismo seletivo pelo qual ocorre a transferência de IgG do sangue para a glândula mamária envolve um conjunto de fatores como receptores na membrana

basal ou intercelular da célula acinar epitelial e controle hormonal na síntese e transporte de imunoglobulinas (Pauletti, 1999; Bessi, 2001).

As imunoglobulinas ativam complemento pela via clássica, e se aderem à superfície de antígenos para fagocitose por macrófagos, granulócitos, linfócitos ou células “Natural Killers” (Paul, 1993).

A secreção de colostro é breve e normalmente os níveis de anticorpos tornam-se insignificantes em 24 horas (Jeffcott, 1974; Koterba et al., 1990; Blood & Radostitis, 1991). O potro deve ingerir colostro nas primeiras 2 horas de vida e em torno de 6 horas imunoglobulinas podem ser encontradas no soro, atingindo pico em 18 horas, em concentração muito próxima a encontrada no soro materno (Jeffcott, 1974; Koterba et al., 1990;).

As imunoglobulinas presentes no colostro são principalmente IgG e IgM e IgA (Rumbough et al., 1979; Koterba et al., 1990). As IgG são as mais abundantes, estando entre 65 a 90% das imunoglobulinas totais, podendo sua concentração total variar entre 2.050 a 7.650 mg/dL. Os níveis de IgM e IgA variam entre 100 a 350 mg/dL e 500 a 1.500 mg/dL, respectivamente (Tizard, 1985).

A quantidade de IgG no colostro varia no momento do parto de 4.000 a 9.000 mg/dL, diminui para menos de 1.000 mg/dL 8 a 19 horas pós-parto (Blood & Radostitis, 1991), variando também de acordo com as raças de eqüinos, conforme achados de LeBlanc & Tran (1987), sendo encontrados níveis mais altos nas raças Árabe e Quarto de Milha, que apresentam um valor médio de 6.100 mg/dL (Koterba et al., 1990).

A gravidade específica do colostro pode ser medida em um colostrômetro e deve ser superior a 1.06, para que potros alcancem concentrações séricas de IgG superior a 500 mg/dL (Koterba et al., 1990).

Segundo Tizard (1985), os níveis séricos de imunoglobulinas em eqüinos adultos hípidos são de 500 a 2.000 mg/dL de IgG, 80 a 200 mg/dL de IgM, 60 a 350 mg/dL de IgA e 100 a 1.500 mg/dL de IgGt.

A concentração mínima de IgG necessária para proteção do potro contra infecções depende de fatores inerentes aos patógenos presentes no meio ambiente, fatores relacionados ao manejo, e ao estresse (McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979, Koterba et al., 1990; Feitosa, 1999).

Diversos estudos demonstram que potros com falha total na transferência de imunidade passiva têm concentração sérica de IgG inferior a 200 mg/dL já quando a falha é parcial, os valores podem variar entre 200 a 400 mg/dL, sendo considerado aceitável acima de 800 mg/dL (Rumbaugh et al., 1979; Parish, 1996; Mellor & Stafford, 2004).

Índices de mortalidade podem atingir 10-12% em espécies uníparas, principalmente em casos de predação e quando não há suporte humano adequado (Mellor & Stafford, 2004). A incidência de falha na transferência de imunidade passiva tem sido estimada em 2,9 a 25%, sendo dependente do desafio ao qual o neonato está exposto (McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979).

Existe relação inversamente proporcional entre níveis séricos de IgG e infecções neonatais, havendo uma incidência de infecção e mortalidade significativamente maior em potros com níveis séricos de IgG inferiores a 400 mg/dL (McGuire et al., 1975; Riddle, 2003).

Um estudo realizado por Raidal (1996), para a determinação da concentração de IgG em 323 potros neonatos, utilizando o método de imunodifusão radial simples (IDRS), revelou que 1,9% (N=6) dos animais apresentaram concentrações de IgG < 400 mg/dL, 5% (N=16) IgG ≤ 400 mg/dL e 9,6% (N=31) IgG < 800 mg/dL. Níveis de IgG < 800 mg/dL nas primeiras 24 horas de vida estiveram associados de forma significativa a um aumento na incidência de doenças infecciosas perinatais.

Uma pesquisa realizada por McGuire et al. (1977) em 62 potros provenientes de um mesmo criatório, com a finalidade de determinar a concentração de IgG no soro pela técnica de imunodifusão radial simples demonstrou que 6 animais (9,7%) apresentavam menos de 200 mg/dL de IgG, mesmo após ingerirem colostro por mais de 24 horas. Quatro dos seis potros apresentaram problemas durante as primeiras duas semanas de vida, incluindo diarreia, pneumonia e infecção do trato respiratório superior. A falha na transferência de imunidade passiva foi atribuída à incapacidade de ingestão do colostro pelo potro (N=1), apesar da assistência realizada nas primeiras 24 horas, assim como pela baixa concentração de IgG (N=2) no leite materno. Em três animais, a causa não foi determinada. Em outra propriedade, 12% de 25 neonatos apresentaram concentração de IgG menor que 200 mg/dL e todos manifestaram diarreia e/ou pneumonia. Segundo os autores, falha parcial ocorreu em 16,1% em uma propriedade, e apenas dois animais manifestaram quadro de infecção discreta, sendo um após 60 dias. Na outra propriedade a falha parcial atingiu

dois animais, dos quais, um desenvolveu artrite e posteriormente veio a óbito. Dos potros com transferência adequada de imunidade passiva, 74,2% na primeira propriedade e 80% na segunda, não apresentaram quadro de infecção.

Townsend et al. (1983) utilizaram prostaglandina sintética na dose de 10 mg via intramuscular para indução de parto, e determinaram por imunodifusão radial simples, a concentração de IgG no soro dos potros neonatos. Os autores constataram concentrações de IgG inferiores às das éguas, tanto no grupo tratado como no controle. Adicionalmente, quatro dos onze potros nascidos de parto induzido morreram ou foram submetidos à eutanásia por apresentarem quadro de fraqueza extrema. A concentração média de IgG no colostro das éguas tratadas foi de 6.438 mg/dL, variando de 3.600 a 10.250 mg/dL, excedendo assim, o valor mínimo recomendado que é de 1.000 mg/dL de IgG. Como não houve caso de lactação prematura ou atraso na ingestão do colostro, foi cogitada a produção inadequada de colostro como a causa da redução dos níveis de IgG no soro dos neonatos.

Conforme resultados encontrados por Morris et al. (1985), mediante a utilização de imunodifusão radial simples, em amostras de soro de equinos coletadas entre 24 e 36 horas após o parto, a concentração de IgG variou entre 112 a 2.948 mg/dL e, apenas 2,9% (4 de 136 amostras), desenvolveram falha na transferência de imunidade passiva. Das quatro éguas que tiveram potros com falha na imunidade passiva, 50% apresentaram lactação prematura. Correlação positiva ( $r=0,58$ ;  $p<0,001$ ) foi observada entre a concentração de IgG no colostro e soro dos potros. Concentração inferior a 1.000 mg/dL foi observada no colostro de duas éguas que apresentaram lactação prematura e seus potros apresentaram concentração de IgG inferior a 500 mg/dL. Os autores encontraram ainda significativa relação entre os testes de imunodifusão radial simples, turbidez por sulfato de zinco e aglutinação em látex.

Buscando aumentar a imunidade do neonato, Chaffin & Cohen (1998), utilizaram antisoro comercial para *Escherichia coli*. Entretanto, os autores não encontraram diferença significativa entre o grupo tratado e o controle quanto à concentração sérica de IgG determinada por imunodifusão radial simples, sendo verificada uma média de 1.600 mg/dL de concentração dessa imunoglobulina em ambos os grupos. Dos 137 animais do grupo tratado, 12 (8,8%) apresentaram FPTP e 6 (4,4%) FTP; já no grupo controle, dos 131 animais avaliados, 8 (6,1%) apresentaram FPTP e 3 (2,3%) FTP. De 61 potros que adoeceram, 48 tiveram doença infecciosa (infecção do trato respiratório superior,

gastrointestinal e/ou urogenital, artrite séptica, quadro dermatológico e septicemia), que não diferiram entre os grupos. Doenças não infecciosas também foram relatadas, como deformidade músculo-esquelética congênita, afecção músculo-esquelética traumática, ulceração gástrica, persistência do úraco, doença neurológica, além de outros quadros sem diagnóstico definitivo.

Um colostro de boa qualidade, ou seja, com altas concentrações de imunoglobulinas tem alta viscosidade e coloração mais amarelada e escura que o leite (Koterba et al., 1990). Porém estes critérios subjetivos podem induzir a erros durante a avaliação da qualidade do colostro, sendo indicado o exame de gravidade específica ou uso de técnicas diretas como imunodifusão radial simples ou métodos imunoenzimáticos como o ELISA.

Além da concentração de IgG no colostro é importante determinar a concentração de IgG no soro sangüíneo. Os métodos disponíveis para avaliação dos níveis séricos de imunoglobulinas incluem os indiretos (refratometria, turbidez pelo sulfato de zinco, coagulação por glutaraldeído, aglutinação no látex) e diretos (eletroforese, imunodifusão radial simples e elisa).

Um método que produz alguns resultados falso-positivos tem maior especificidade, já quando produz alguns resultados falso-negativos tem maior sensibilidade. O ideal é que a técnica tenha alta sensibilidade e especificidade, como é o caso da imunodifusão radial simples. Infelizmente esta técnica leva de 18 a 24 horas para se obter os resultados, além de exigir maiores recursos laboratoriais. Em contraste, existem testes mais simples e rápidos. Nesse sentido, o ideal é que ele possua maior sensibilidade para minimizar as falhas na classificação de potros imunodeficientes.

A imunodifusão radial simples é baseada no teste de anti-soro específico contido em matriz de gel reagindo com o soro do paciente. O tamanho dos anéis de precipitação produzidos pela difusão do soro testado é comparado com padrões conhecidos, dando informação de classe e subclasse de imunoglobulina específica (Mancini et al., 1965; Rumbaugh et al., 1979). Apesar de ser considerado o teste de escolha para a determinação de FTP, a não disposição imediata dos resultados, o alto custo e a dependência de equipamentos limitam a aplicação desta técnica (Pfeiffer et al. 1977; Feitosa et al., 2001).

O objetivo deste estudo foi determinar a transferência de imunidade passiva em neonatos eqüinos mediante a utilização do método de imunodifusão radial simples e

verificar a correlação entre a concentração de IgG no soro materno, no colostro e no soro do neonato.

## 2.4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados potros neonatos mestiços da raça Bretão pertencentes ao Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As éguas progenitoras, com idade média de 12 anos, permaneceram durante o período de gestação em piquetes com grama estrela (*Cynodon dactylon*) e capim gordura (*Melinis munitiflora*), sendo oferecido também capim elefante (*Pennisetum purpureum Schum*) picado e concentrado nos meses em que a forragem era mais escassa. Adicionalmente, recebiam sal mineral e a água era proveniente de açudes artificiais e bebedouros.

Os animais possuíam pequena diferença com relação ao grau de sangue, mas apresentavam condições nutricionais e higiênico-sanitárias homogêneas.

Conforme a proximidade do parto, determinada pela data de cobertura, aumento da glândula mamária e relaxamento dos ligamentos pélvicos, as éguas foram separadas em piquetes maternidade, de aproximadamente 1000 m<sup>2</sup>, com pequena área coberta, cocho, bebedouro e relevo ligeiramente inclinado, para maior segurança nos momentos do parto.

### 2.4.1. Coleta das amostras

Todos os partos foram acompanhados à distância e amostras de 10 mL de sangue foram coletadas, em tubos a vácuo sem anticoagulante, por venipunção jugular. Amostras de colostro (10 mL) também foram coletadas.

A coleta das amostras de sangue foi realizada em seis tempos: T1= logo após o parto (égua e potro), somente dos potros nos tempos T2 = 6 horas, T3 = 12 horas, T4 = 24 horas, T5 = 48 horas e T6 = 30 dias após a primeira mamada. As amostras do colostro foram realizadas em três tempos: T1 = logo após o parto e antes da ingestão pelo potro, T2= 12 horas e T3 = 48 horas.

Após sedimentação em temperatura ambiente e centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos, amostras de soro foram separadas, identificadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de realização dos exames no Laboratório de biologia e controle de hematozoários (LBCH) BIOAGRO/UFV. Da mesma forma, as amostras de colostro foram identificadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até descongelamento e centrifugação para separação do soro no momento de realização dos exames.

Todas as coletas foram realizadas por Médico Veterinário, após exame físico dos animais, e de forma a causar o mínimo de estresse ou interferência na interação entre égua e potro.

#### **2.4.2. Imunodifusão radial simples (IDRS)**

Para a realização da técnica, modificada de Mancini et al. (1965), inicialmente se obteve anticorpos anti-IgG eqüina de coelhos, mediante a realização de quatro inoculações seriadas (via subcutânea, em intervalos de quinze dias), de IgG eqüina em solução 1:1 de salina 0,9% e adjuvante completo de Freund, para a primeira inoculação e incompleto para as demais.

Na primeira, terceira e quarta inoculações utilizou-se 1 mg de IgG eqüina em 800  $\mu\text{L}$  do adjuvante e, na segunda inoculação, utilizou-se 2 mg de IgG eqüina em 400  $\mu\text{L}$  da solução. Sete dias após a quarta inoculação observou-se, por imunodifusão radial dupla com IgG eqüina e soro de coelho inoculado, titulação adequada. Os coelhos foram então sacrificados para obtenção de soro hiperimune.

O soro proveniente dos coelhos foi diluído em agarose a 1% em salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,2, na proporção 1:50, para preparação de placas de poliestireno (cultivo celular).

Após polimerização em temperatura ambiente, foram realizados orifícios de aproximadamente 2,5 mm, para a deposição de soluções contendo concentração conhecida de IgG eqüina e das amostras de soro diluídas na proporção 1:40 em água Mili-Q. Já as

amostras de colostro foram diluídas na proporção 1:100. As medidas dos anéis formados por precipitação nas amostras conhecidas foram utilizadas para estabelecer uma regressão linear e posterior quantificação em mg/dL das amostras testadas.

### **2.4.3. Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa SAEG, versão 9.0 (UFV, 2001). Inicialmente foi realizada a estatística descritiva dos dados e, subseqüentemente, a análise de variância (ANOVA) e teste de média Tukey 5%, para se avaliar a variação dos valores médios de IgG obtidos por IDRS no soro sanguíneo e do colostro. Adicionalmente, foram promovidas correlação entre as concentrações de IgG obtidas no soro e colostro das éguas e no soro das éguas e dos potros.

## 2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O acompanhamento dos partos à distância não provocou prejuízo aos mesmos. Com a contenção adequada dos animais, a coleta das amostras foi facilmente realizada, não ocorrendo danos como hematoma e flebite ou interferência na interação égua-potro.

A coleta, armazenamento e processamento das amostras, empregados na metodologia, mostraram-se simples e eficazes. Com a centrifugação do colostro foi possível separar o soro, que posteriormente foi utilizado para a técnica de imunodifusão radial simples.

A técnica de imunodifusão radial simples exigiu tempo para realização, uma vez que não foram utilizados kits comerciais e o anticorpo anti-IgG equina precisou ser produzido. Diversas diluições foram testadas, tanto do anti-soro quanto das amostras, para se atingir uma equivalência adequada à formação dos anéis de precipitado e evitar a ocorrência de erros, observados em amostras de grandes concentrações de imunoglobulina G, como relatado por Pfeiffer et al. (1977) e Feitosa et al. (2001).

Encontrou-se uma equivalência adequada entre antígeno-anticorpo (Ag-Ac), com a diluição do anti-soro na proporção de 1:50 na solução de agarose a 1% e diluição das amostras de soro do colostro e soro sanguíneo na proporção de 1:100 e de 1:40, respectivamente, em água Mili-Q. Tais diluições tornaram os testes sensíveis para determinar concentrações de IgG a partir de 100 mg/dL.

O valor mínimo de IgG do colostro na primeira coleta foi de 1.489 mg/dL e máximo de 7.921 mg/dL, com média de 4.772 mg/dL, representando valores inferiores aos

encontrados por Townsend et al. (1983), quando variaram de 3.600 a 10.250 mg/dL, com média de 6.438 mg/dL, porém com valores máximos superiores aos mencionados por Tizard (1985), que variaram entre 2.050 a 7.650 mg/dL. Os valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão obtidos em cada tempo estão apresentados na Tabela 1.

Houve queda significativa nos valores médios da concentração de IgG em cada tempo, conforme esperado e mencionado por Jeffcott (1974), Koterba et al. (1990) e Blood & Radostitis (1991). Por outro lado, diferentemente do que é citado por estes autores, as concentrações de IgG não se tornaram insignificantes em 24 horas, pois níveis significativos foram encontrados com 48 horas em 64,7% (N=11), sendo que sete animais (41,17%) ainda mantiveram níveis acima de 1000 mg/dL, citado como limite mínimo adequado por Morris et al. (1985) e Townsend et al. (1983).

TABELA 1 - Valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão em mg/dL de imunoglobulina G no colostro nos tempos T1 (momento do parto), T2 (12 horas pós-parto) e T3 (48 horas pós-parto), determinados por imunodifusão radial simples.

<i>Tempos</i>	<i>Valores (mg/dL)</i>		<i>Média±Desvios</i>
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	
T1	1.489	7.921	4.772±2336a
T2	<100	4.394	2.556±1602b
T3	<100	3.564	1.097±1218c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

O valor mínimo e máximo de IgG no soro das éguas foi de 1.348 mg/dL e de 2674 mg/dL, respectivamente. O valor médio foi de 2.103,47mg/dL, estando acima dos valores de 500 a 2.000 mg /dL, citados como referência por Tizard (1985).

No soro dos potros, foi observado um valor mínimo menor que 100 mg/dL de IgG ao nascer e 2.653 mg/dL em 12 horas, respectivamente. Os valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão obtidos em cada tempo estão apresentados na Tabela 2. Não ocorreram oscilações individuais e os níveis foram crescentes a partir do nascimento até atingir seu valor máximo. Posteriormente houve pequena queda até atingir os 30 dias após

o parto. A média no tempo T4 (24 horas pós-parto) foi de 1.981 mg/dL, sendo superior à relatada por Chaffin & Cohen (1998), que foi de 1.600 mg/dL.

O momento de maior valor na concentração de IgG ocorreu em 17,64% (N=3) dos animais no tempo T3 (12 horas); em 17,64% (N=3) no T4 (24 horas) e em 64,7% (N=11) no T5 (48 horas), diferentemente das 18 horas citada por Jeffcott (1974) e Koterba et al. (1990). Por outro lado, assim como citado por estes autores, os valores foram muito próximos aos maternos, sendo que em 41,17% dos potros (N=7), foram ainda superiores.

As médias para cada tempo, quando comparadas pelo método de Tukey 5%, apresentaram diferença significativa entre o tempo T1 e os demais tempos (Tabela 2). Não havendo diferença estatisticamente significativa entre os tempos T2, T4, e T6 e entre os tempos T3, T4, T5 e T6.

TABELA 2 - Valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão (mg/dL) de imunoglobulina G no soro dos potros nos tempos T1 (momento do parto), T2 (6 horas pós-parto), T3 (12 horas pós-parto), T4 (24 horas pós-parto), T5 (48 horas pós-parto) e T6 (30 dias pós-parto), determinados por imunodifusão radial simples.

<i>Tempos</i>	<i>Valores (mg/dL)</i>		<i>Média±Desvio</i>
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	
T1	<100	<100	<100 ± 0 c
T2	<100	2.213	1.573,18 ± 604 b
T3	1.096	2.653	2.016,65 ± 412 a
T4	1.508	2.570	1.981,06 ± 380 ab
T5	1.253	2.625	2.036,59 ± 307 a
T6	1.098	2.213	1.762,71 ± 334 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

Assim como relatado por Jeffcott (1974) e Koterba et al. (1990), neste estudo puderam ser detectadas imunoglobulinas no soro dos neonatos 6 horas após ingestão do colostro, o que ocorreu em 16 animais (94,12%). Apenas um potro ainda não havia atingido níveis adequados de IgG neste período.

Não foi encontrada correlação significativa entre a concentração de IgG no soro das éguas e respectivo colostro no momento do parto ( $r = -0,143$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 1). Este fato pode ser explicado pelo mecanismo seletivo, descrito por Pauletti (1999) e Bessi (2001), determinado por receptores na membrana basal ou intercelular da célula acinar epitelial, além de controle hormonal na síntese e transporte de imunoglobulinas para o colostro, que independem da concentração de IgG no sangue da égua.

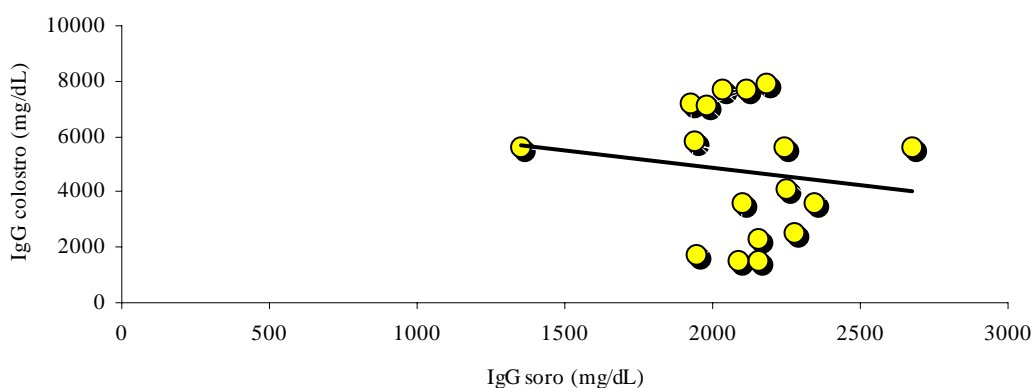


FIGURA 1 - Representação gráfica da dispersão da concentração média de IgG (mg/dL) obtida por IDRS no colostro das éguas e soro sanguíneo no momento do parto.

As concentrações de IgG no colostro no momento do parto, com 12 e 48 horas, apresentaram correlação negativa ( $r = -0,92$ ;  $p < 0,0001$ ) com o soro do potro no momento do nascimento, com 6 e 12 horas (Figura 2), indicando que a queda gradativa desta imunoglobulina no leite materno após o parto é acompanhada do incremento do mesmo no soro do neonato.

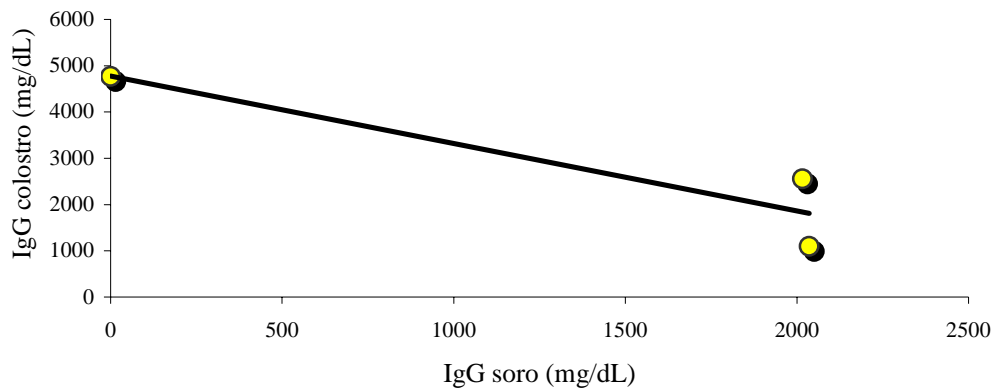


FIGURA 2 - Representação gráfica da dispersão da concentração média de IgG (mg/dL) obtida por IDRS no colostro das éguas e no soro dos neonatos no momento do parto, assim como com 12 e 48 horas.

Observou-se correlação positiva ( $r=0,73$ ;  $p<0,0001$ ) entre a concentração de IgG no soro das éguas no momento do parto e a concentração de IgG no soro dos neonatos no momento de maior valor para cada animal (Figura 3), quando a ingestão e absorção do colostro não sofreu qualquer interferência além do simples estímulo à primeira mamada natural, sendo superior à encontrada por Morris et al. (1985), que foi de  $r=0,14$  ( $p<0,06$ ).

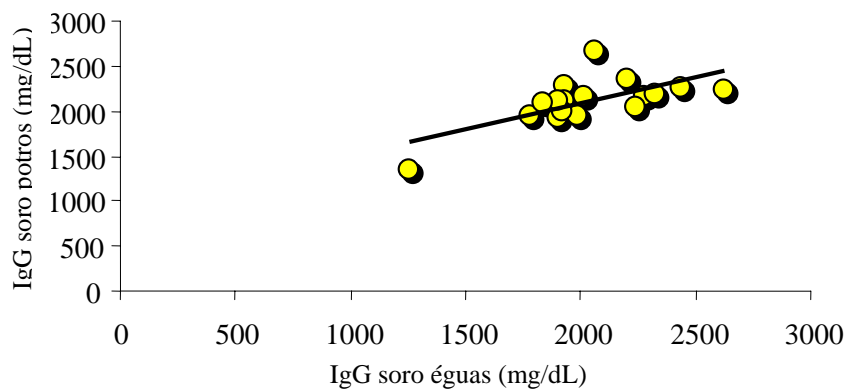


FIGURA 3 - Representação gráfica da dispersão da concentração máxima de IgG (mg/dL) obtida por IDRS no soro dos neonatos no momento individual de maior valor e concentração de IgG no soro das éguas no momento do parto.

## **2.6. CONCLUSÕES**

1. Concentrações de IgG no colostro de éguas acima de 1.000 mg/dL, podem ser encontradas mesmo 48 horas após o parto;
2. Não existe equivalência entre a concentração de IgG no soro das éguas e respectivo colostro;
3. Existe equivalência entre a concentração de IgG no soro das éguas e concentração máxima dessa imunoglobulina no soro dos neonatos;
4. Existe correlação inversamente proporcional entre as concentrações de IgG no colostro e soro de neonatos eqüinos do momento do parto até 48 horas após o mesmo.

## 2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESSI, R. **Estudo da absorção de anticorpos do colostro em bezerros recém-nascidos.** Piracicaba: ESALQ/USP, 2001. Dissertação (doutorado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 2001. 58p.

BLOOD, D.C., RADOSTITIS, O.M. Doenças do recém-nascido. In: BLOOD, D.C., RADOSTITIS, O.M. (Eds). **Clínica Veterinária**, 7 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 3, p. 81-104.

CHAFFIN, M. K., COHEN, N. D.. Randomized controlled trial of effects of *Escherichia coli* antiserum on serum immunoglobulin G concentrations and morbidity and mortality rates in foals **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.212, n.11, p.1746-1750, 1998.

FEITOSA, F.L.F. Importância da transferência da imunidade passiva para a sobrevivência de bezerros neonatos. **Revista de Educação Continuada - CRMV-SP**, v.2, n.3, p.17-22, 1999.

FEITOSA, F.L.F., BIRGEL, E.H., MIRANDOLA, R.M.S. et al. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e

de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gama glutamil transferase no soro sanguíneo. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.251-255, 2001.

JEFFCOT, L.B. Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. **Equine Veterinary Journal**, v.6, n.3, p.109-115, 1974.

KOTERBA, A.M.; DRUMOND, W.H.; KOSCH, P.C. **Equine clinical neonatology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. 846p.

LeBLANC, M.M.; TRAN, T.Q. Relationships among colostrum electrolytes, colostrum IgG concentrations and absorption of colostrum IgG by foals. **Journal of Reproduction Fertility**, n.35, v.735, p.619-622, 1987.

MANCINI, G., CARBONARA, A.O., HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v.2, n.3, p.235-254, 1965.

McCLURE, J.T.; MILLER, J.; DeLUCA, J.L. **Comparison of two ELISA screening tests and a non-commercial glutaraldehyde coagulation screening test for the detection of failure of passive transfer in neonatal foals**, 2003. Capturado em 25 de outubro de 2004. Online. Disponível na Internet: <http://www.ivis.org>.

McGUIRE, T.C.; CRAWFORD, T.B.; HALLOWELL, A.L. et al. Failure of colostrum immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.170, n.11, p.1302-1304, 1977.

McGUIRE, T.C.; POPPIE, M.J.; BANKS, K.L. Hypogammaglobulinemia predisposing to infections in foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.166, n.71, p.1138-1140, 1975.

MELLOR, D.J.; STAFFORD, K.J. Animal welfare implications of neonatal mortality and morbidity in farm animals. **The Veterinary Journal**, v.168, n.15, p.118-133, 2004.

MORRIS, D.D.; MEIRS, D.A.; MERRYMAN, G.S. Passive transfer failure in horses: incidence and causative factors on a breeding farm. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.11, p.2294-2297, 1985.

PARISH, S.M. Ruminant immunodeficiency diseases. In: SMITH, B.P. (Ed). **Large animal internal medicine**. 2<sup>nd</sup> ed. St.Louis: Mosby, 1996. p.1857-1860.

PAUL, W.E. **Fundamental immunology**, 3<sup>rd</sup> ed. New York: Raven Press, 1993. 1490p.

PAULETTI, P. **Efeito de diferentes níveis iniciais de imunoglobulinas adquiridas do colostro sobre a flutuação de proteínas séricas e desempenho de bezerras da raça holandesa**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 1999. 104p.

PFEIFFER, N.E., MCGUIRE, T.C., BENDEL, R.B. Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.5, p.693-698, 1977.

RAIDAL, S.L. The incidence and consequences of failure of passive transfer of immunity on a Thoroughbred breeding farm. **Australian Veterinary Journal**, v.73, n.6, p.201-206, 1996.

RIDDLE, W.T. **Preparation of the mare for normal parturition**. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 49, 2003. Capturado em 26 de outubro de 2004. Online. Disponível na Internet: [www.ivis.org](http://www.ivis.org).

RUMBAUGH, G.E.; ARDANS, A.A.; GINNO, D. et al. Identification and treatment of colostrum-deficient foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.174, n.3, p.273-276, 1979.

SUSIN, I. **Concentrações séricas de proteína total e imunoglobulinas, e desempenho de bezerros submetidos a diferentes regimes de aleitamento e épocas de desmame.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1985. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 1985. 89p.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária**, 2<sup>d</sup> ed. São Paulo: Roca, 1985. 329p.

TOWNSEND, H.G.G.; TABEL, H.; BRISTOL, F.M. Induction of parturition in mares: effecton passive transfer of immunity to foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.182, n.3, p.255-257, 1983.

UFV - Universidade Federal de Viçosa. SAEG (2001). **Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 9.0 (manual do usuário). Viçosa, MG. 301p.

**3. CAPÍTULO 3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IgG NO SORO DE  
NEONATOS EQÜINOS: COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE  
IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES E TURVAÇÃO PELO SULFATO DE  
ZINCO**

**LANG, André; Universidade Federal de Viçosa.**

### 3.1. RESUMO

LANG, André, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2006. “**Determinação da concentração de IgG no soro de neonatos eqüinos: comparação entre os métodos de imunodifusão radial simples e turvação pelo sulfato de zinco**”. Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-Orientadores: José Dantas Ribeiro Filho e Luiz Gonzaga Pompermeyer.

O objetivo deste estudo foi determinar os níveis séricos de imunoglobulina G em neonatos eqüinos pelo método de imunodifusão radial simples (IDRS) e sua variação ao longo do tempo após o parto, bem como comparar os dados obtidos com esta metodologia com aqueles alcançados com a técnica de turbidez pelo sulfato de zinco (TSZ) analisada por espectrofotometria. Para isso, foram utilizados 17 neonatos, mestiços da raça Bretão. Os partos foram acompanhados e amostras de sangue foram coletadas dos potros logo após o nascimento, assim como com 6, 12, 24, 48 horas e 30 dias após o mesmo. O maior valor na concentração de IgG foi obtido com 48 horas após o parto, com um valor médio de 2.036 mg/dL, alcançado pela técnica de IDRS e de 1.874 mg/dL pela TSZ. A comparação dos valores médios de IgG obtidos em cada tempo indicou o período de 12 horas após o parto como o tempo ideal para a determinação da concentração de IgG por ambos os métodos. Correlação significativa foi observada entre a concentração de IgG no soro determinada por IDRS com a encontrada por TSZ, estando os coeficientes de variação muito próximos.

**Palavras-chave:** Potros, IDRS, TSZ.

### 3.2. ABSTRACT

LANG, André, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2006. “**Determination of IgG concentration in newborn foals serum: comparing the single radial immunodifusion and zinc sulfate turbidity methods**”. Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-Advisers: José Dantas Ribeiro Filho and Luiz Gonzaga Pompermeyer.

The objective of this study was to determine the serum levels of immunoglobulin G in newborn foals through the method single radial immunodiffusion (SRID) and its variation along time after birth, as well as to compare the data obtained with this methodology with those obtained with the technique zinc sulfate turbidity (ZST) analyzed by spectrophotometry. Thus, 17 Breton cross bred animals were used. Births were monitored and blood samples collected from the foals immediately and 6, 12, 24, 48 h and 30 after birth. The highest IgG concentration value was obtained 48 h after birth, with a mean value of 2.036 mg/dL, using the SRID technique and of 1.874 mg/dL, using ZST. Comparing the mean IgG values obtained each time indicated a period of 12 h after birth as the ideal time for determining IgG concentration in both the methods. A significant correlation was observed between IgG concentrations in the serum determined by SRID with that by ZST, with the coefficients of variation being very close.

**Key-words:** Foals, SRID, ZST.

### 3.3. INTRODUÇÃO

A mortalidade de eqüinos neonatos representa grande prejuízo na criação de eqüinos. Aspectos como tipo de placenta, qualidade do colostro, assistência ao parto e ambiente interferem de forma direta na transferência de imunidade passiva. Como as mais freqüentes causas de óbito de potros nas duas primeiras semanas de vida ocorrem, na sua maioria, por doenças infecciosas é importante conhecer o estado imunológico do potro nos primeiros momentos de vida.

Existem diversas formas de se verificar a transferência de imunidade passiva, sendo a determinação de imunoglobulina G a mais utilizada. Entretanto, aspectos econômicos e sociais tornam importante a busca por técnicas de baixo custo e praticidade na realização, principalmente em situações de campo.

Os potros nascem hipo ou agamaglobulinêmicos devido ao tipo de placenta epiteliocorial difusa da égua, que apresenta seis camadas teciduais entre a circulação sangüínea materna e fetal, compreendendo o endotélio capilar materno, tecido conjuntivo uterino, epitélio uterino, epitélio coriônico, tecido conjuntivo fetal e endotélio capilar fetal, que promovem uma barreira para a transferência transplacentária de anticorpos (Jeffcott, 1974; Tizard, 1985; Feitosa et al., 2001).

Pela dificuldade na passagem de anticorpos para o feto, a defesa imunológica do neonato depende da ingestão e absorção do colostro. O colostro é a primeira secreção láctea por ocasião do parto, constituído de leite e elementos do soro sangüíneo como as imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G (Tizard, 1985; Parish, 1996). O mecanismo seletivo pelo qual ocorre a transferência de IgG do sangue para a glândula

mamária envolve um conjunto de fatores como receptores na membrana basal ou intercelular da célula acinar epitelial e controle hormonal na síntese e transporte de imunoglobulinas (Pauletti, 1999; Bessi, 2001).

As imunoglobulinas ativam a cascata de complemento pela via clássica, e se aderem à superfície de antígenos para fagocitose por macrófagos, granulócitos, linfócitos ou células “Natural Killers” (Paul, 1993).

Segundo Tizard (1985), os níveis séricos de imunoglobulinas em equinos adultos hípidos são de 500 a 2.000 mg/dL de IgG, 80 a 200 mg/dL de IgM, 60 a 350 mg/dL de IgA e 100 a 1.500 mg/dL de IgGt.

A concentração mínima de IgG necessária para proteção do potro contra infecções dependem de fatores inerentes aos patógenos presentes no meio ambiente, fatores relacionados ao manejo, e ao estresse (McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979, Koterba et al., 1990; Feitosa, 1999).

Diversos estudos demonstram que potros com falha total na transferência de imunidade passiva (FTP) têm concentração sérica de IgG inferior a 200 mg/dL já quando a falha é parcial (FPTP), os valores podem variar entre 200 a 400 mg/dL, sendo considerado aceitável acima de 800 mg/dL (Rumbaugh et al., 1979; Parish, 1996; Mellor & Stafford, 2004).

Índices de mortalidade podem atingir 10-12% em espécies uníparas, principalmente em casos de predação e quando não há suporte humano adequado (Mellor & Stafford, 2004). A incidência de falha na transferência de imunidade passiva tem sido estimada em 2.9 a 25%, sendo dependente do desafio ao qual o neonato está exposto (McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979).

Existe relação inversamente proporcional entre níveis séricos de IgG e infecções neonatais, havendo uma incidência de infecção e mortalidade significativamente maior em potros com níveis séricos de IgG inferiores a 400 mg/dL (McGuire et al., 1975; Riddle, 2003).

Um estudo realizado por Raidal (1996), para a determinação da concentração de IgG em 323 potros neonatos, utilizando o método de imunodifusão radial simples (IDRS), revelou que 1,9% (N=6) dos animais apresentaram concentrações de IgG < 400 mg/dL, 5% (N=16) IgG ≤ 400 mg/dL e 9,6% (N=31) IgG < 800 mg/dL. Níveis de IgG < 800 mg/dL

nas primeiras 24 horas de vida estiveram associados de forma significativa a um aumento na incidência de doenças infecciosas perinatais.

Uma pesquisa realizada por McGuire et al. (1977) em 62 potros provenientes de um mesmo criatório, com a finalidade de determinar a concentração de IgG no soro pela técnica de imunodifusão radial simples demonstrou que 6 animais (9,7%) apresentavam menos de 200 mg/dL de IgG, mesmo após ingerirem colostro por mais de 24 horas. Quatro dos seis potros apresentaram problemas durante as primeiras duas semanas de vida, incluindo diarreia, pneumonia e infecção do trato respiratório superior. A falha na transferência de imunidade passiva foi atribuída à incapacidade de ingestão do colostro pelo potro (N=1), apesar da assistência realizada nas primeiras 24 horas, assim como pela baixa concentração de IgG (N=2) no leite materno. Em três animais, a causa não foi determinada. Em outra propriedade, 12% de 25 neonatos apresentaram concentração de IgG menor que 200 mg/dL e todos manifestaram diarreia e/ou pneumonia. Segundo os autores, falha parcial ocorreu em 16,1% na primeira propriedade, e apenas dois animais manifestaram quadro de infecção discreta, sendo um após 60 dias. Na segunda propriedade a falha parcial atingiu dois animais dos quais um desenvolveu artrite e posteriormente veio a óbito. Dos potros com transferência adequada de imunidade passiva, 74,2% na primeira propriedade e 80% na segunda, não apresentaram quadro de infecção.

Townsend et al. (1983) utilizaram prostaglandina sintética na dose de 10 mg via intramuscular para indução de parto, e determinaram por imunodifusão radial simples, a concentração de IgG no soro dos potros neonatos. Os autores constataram concentrações de IgG inferiores às das éguas, tanto no grupo tratado como no controle. Adicionalmente, quatro dos onze potros nascidos de parto induzido morreram ou foram submetidos à eutanásia por apresentarem quadro de fraqueza extrema. A concentração média de IgG no colostro das éguas tratadas foi de 6438 mg/dL, variando de 3.600 a 10.250 mg/dL, excedendo assim, o valor mínimo recomendado que é de 1.000 mg/dL de IgG. Como não houve caso de lactação prematura ou atraso na ingestão do colostro, foi cogitada a produção inadequada de colostro como a causa da redução dos níveis de IgG no soro dos neonatos.

Conforme resultados encontrados por Morris et al. (1985), mediante a utilização de imunodifusão radial simples, em amostras de soro de equinos coletadas entre 24 e 36 horas após o parto, a concentração de IgG variou entre 112 a 2.948 mg/dL e, apenas 2,9% (4 de 136 amostras), desenvolveram falha na transferência de imunidade passiva. Das quatro

éguas que tiveram potros com falha na imunidade passiva, 50% apresentaram lactação prematura. Correlação positiva ( $r=0,58$ ;  $p<0,001$ ) foi observada entre a concentração de IgG no colostro e soro dos potros. Concentração inferior a 1.000 mg/dL foi observada no colostro de duas éguas que apresentaram lactação prematura e seus potros apresentaram concentração de IgG inferior a 500 mg/dL. Os autores encontraram ainda significativa relação entre os testes de imunodifusão radial simples, turbidez por sulfato de zinco e aglutinação em látex.

Buscando aumentar a imunidade do neonato, Chaffin & Cohen (1998), utilizaram antisoro comercial para *Escherichia coli*. Entretanto, os autores não encontraram diferença significativa entre o grupo tratado e o controle quanto à concentração sérica de IgG determinada por imunodifusão radial simples, sendo verificada uma média de 1.600 mg/dL de concentração dessa imunoglobulina em ambos os grupos. Dos 137 animais do grupo tratado, 12 (8,8%) apresentaram FPTP e 6 (4,4%) FTP; já no grupo controle, dos 131 animais avaliados, 8 (6,1%) apresentaram FPTP e 3 (2,3%) FTP. De 61 potros que adoeceram, 48 tiveram doença infecciosa (infecção do trato respiratório superior, gastrointestinal e/ou urogenital, artrite séptica, quadro dermatológico e septicemia), que não diferiram entre os grupos. Doenças não infecciosas também foram relatadas, como deformidade músculo-esquelética congênita, afecção músculo-esquelética traumática, ulceração gástrica, persistência do úraco, doença neurológica, além de outros quadros sem diagnóstico definitivo.

Os métodos disponíveis para avaliação dos níveis séricos de imunoglobulinas incluem os indiretos (refratometria, turbidez pelo sulfato de zinco, coagulação por glutaraldeído, aglutinação no látex) e diretos (eletroforese, imunodifusão radial simples e elisa).

Um método que produz alguns resultados falso-positivos tem maior especificidade, já quando produz alguns resultados falso-negativos tem maior sensibilidade. O ideal é que a técnica tenha alta sensibilidade e especificidade, como é o caso da imunodifusão radial simples. Infelizmente esta técnica leva de 18 a 24 horas para se obter os resultados, além de exigir maiores recursos laboratoriais. Em contraste, existem testes mais simples e rápidos. Nesse sentido, o ideal é que ele possua maior sensibilidade para minimizar as falhas na classificação de potros imunodeficientes (McClure et al., 2003).

A imunodifusão radial simples é baseada no teste de anti-soro específico contido em matriz de gel reagindo com o soro do paciente. O tamanho dos anéis de precipitação produzidos pela difusão do soro testado é comparado com padrões conhecidos, dando informação de classe e subclasse de imunoglobulina específica (Mancini et al., 1965; Rumbaugh et al., 1979). Apesar de ser considerado o teste de escolha para a determinação de FTP, a não disposição imediata dos resultados, o alto custo e a dependência de equipamentos limita a aplicação desta técnica (Pfeiffer et al., 1977; Feitosa et al., 2001).

O teste de turbidez do sulfato de zinco depende da formação de sais precipitados pela combinação química de globulinas de alto peso molecular com íons metálicos. A turbidez do soro sanguíneo do neonato pode ser medida pela absorção ou redução da transmissão de luz por espectrofotometria (teste quantitativo), ou estimada visualmente (teste qualitativo) e comparado ao teste realizado com o soro materno (Pfeiffer et al., 1977; Raidal, 1996; McGowan et al, 1997).

A finalidade deste trabalho foi determinar as variações dos níveis séricos de imunoglobulina G em neonatos eqüinos pelo método de imunodifusão radial simples (IDRS) e turbidez pelo sulfato de zinco (TSZ), bem como comparar as duas técnicas.

### 3.4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 17 potros neonatos mestiços da raça Bretão, pertencentes ao Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As éguas, com idade média de 12 anos, permaneceram durante o período de gestação em piquetes com grama estrela (*Cynodon dactylon*) e capim gordura (*Melinis munitiflora*), sendo oferecido também, capim elefante (*Pennisetum purpureum Schum*) picado e concentrado nos meses em que a forragem era mais escassa. Adicionalmente, recebiam sal mineral e a água era proveniente de açudes artificiais e bebedouros.

Os animais possuíam pequena diferença com relação ao grau de sangue, mas apresentavam condições nutricionais e higiênico-sanitárias homogêneas.

Conforme a proximidade do parto, determinada pela data de cobertura, aumento da glândula mamária e relaxamento dos ligamentos pélvicos, as éguas eram separadas em piquetes maternidade, de aproximadamente 1000 m<sup>2</sup>, com pequena área coberta, cocho, bebedouro e relevo ligeiramente inclinado, para maior segurança nos momentos do parto.

#### 3.4.1. Coleta das amostras

Todos os partos foram acompanhados à distância e amostras de 10 mL de sangue foram coletadas, em tubos a vácuo sem anticoagulante, por venipunção jugular.

A coleta das amostras foi realizada em seis tempos: T1 = logo após o nascimento, T2 = 6 horas, T3 = 12 horas, T4 = 24 horas, T5 = 48 horas e T6 = 30 dias, após a primeira mamada.

Após sedimentação em temperatura ambiente e centrifugação a 5000 rpm, por 10 minutos, amostras de soro foram separadas, identificadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de realização das análises.

Todas as coletas foram realizadas por Médico Veterinário, sob cuidadosa contenção e após exame físico dos animais, e de forma a causar o mínimo de estresse ou interferência na interação entre égua e potro.

### **3.4.2. Imunodifusão radial simples (IDRS)**

Para a realização da técnica, modificada de Mancini et al. (1965), inicialmente se obteve anticorpos anti-IgG eqüina de coelhos, mediante a realização de quatro inoculações seriadas (via subcutânea, em intervalos de quinze dias), de IgG eqüina em solução 1:1 de salina 0,9% e adjuvante completo de Freund, para a primeira inoculação e incompleto para as demais.

Na primeira, terceira e quarta inoculações utilizou-se 1 mg de IgG eqüina em 800  $\mu\text{L}$  do adjuvante e, na segunda inoculação, utilizou-se 2 mg de IgG eqüina em 400  $\mu\text{L}$  da solução. Sete dias após a quarta inoculação observou-se, por imunodifusão radial dupla com IgG eqüina e soro de coelho inoculado, titulação adequada. Os coelhos foram então sacrificados para obtenção de soro hiperimune.

O soro proveniente dos coelhos foi diluído em agarose a 1% em salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,2, na proporção 1:50, para preparação de placas de poliestireno (cultivo celular).

Após polimerização em temperatura ambiente, foram realizados orifícios de aproximadamente 2,5 mm, para a deposição de soluções contendo concentração conhecida de IgG eqüina e das amostras de soro diluídas na proporção 1:40 em água Mili-Q. As medidas dos anéis formados por precipitação nas amostras conhecidas foram utilizadas para estabelecer uma regressão linear e posterior quantificação em mg/dL das amostras testadas.

### **3.4.3. Turbidez pelo sulfato de zinco (TSZ)**

Seguindo as indicações de Silva et al. (1988) e Koterba et al. (1990), imediatamente antes da realização do teste, foi preparada uma solução com 125 mg de sulfato de zinco em 500mL de água Mili-Q.

Para a realização do teste, 0,1 mL de soro foi adicionado a 6 mL de  $ZnSO_4$ , sendo a solução mantida em repouso por 60 minutos em temperatura ambiente, quando então foi realizada a leitura em espectrofotômetro mediante comprimento de onda de 485 nm, utilizando como controle ou “amostra em branco” 0,1 mL de soro e 6 mL de água Mili-Q.

Os resultados foram comparados com uma curva-padrão como realizado por Silva et al. (1984).

#### **3.4.4. Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa SAEG, versão 9.0 (UFV, 2001). Inicialmente foi realizada a estatística descritiva dos dados e, subseqüentemente, a análise de variância (ANOVA) e teste de média Tukey ( $p < 0,05$ ), para se avaliar a existência ou não de similaridade entre os valores médios de IgG obtidos com o método de TSZ (espectrofotometria e escala de cinza) e IDRS, nos diferentes tempos.

Correlação e coeficiente de variação foram usados para comparação entre os testes TSZ (espectrofotometria e escala de cinza) e o teste-padrão (IDRS) para verificação da confiabilidade.

### **3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O acompanhamento dos partos à distância não provocou prejuízo aos mesmos. Com a contenção adequada dos animais, a coleta das amostras foi facilmente realizada, não ocorrendo danos como hematoma e flebite ou interferência na interação égua-potro.

#### **3.5.1. Imunodifusão radial simples (IDRS)**

Apesar da eficácia do método de imunodifusão radial simples, o seu custo é elevado, já que as placas de gel com anticorpos anti-imunoglobulinas de eqüinos não são produzidas no Brasil. Sendo assim, o processamento das amostras só é possível mediante a importação desse material ou produção própria, conforme utilizado neste estudo, o que exige tempo e custos inviáveis em pequena escala. O tempo gasto para realização da imunodifusão radial e apresentação dos resultados é outro fator limitante para seu uso no diagnóstico precoce de falha na transferência de imunidade passiva em potros, pois as leituras só podem ser realizadas a partir de 24 horas após a aplicação das amostras de soro nas placas, o que compromete a assistência clínica aos animais com hipogamaglobulinemia como destacado por vários autores (Jeffcott, 1974; McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979; Koterba et al., 1990; Stoneham et al., 1991; Parish, 1996; McGowan et al., 1997; Mellor & Stafford, 2004).

Quando não se utiliza kit comercial, diversas diluições devem ser testadas, tanto do anti-soro quanto das amostras, para se atingir uma equivalência adequada à formação dos anéis de precipitado. A ocorrência de erros, observados em amostras de grandes

concentrações de imunoglobulina G é relatada por Pfeiffer et al. (1977) e Feitosa et al. (2001). Neste estudo, diversas diluições foram testadas sem que ocorresse a formação dos anéis característicos. Após várias tentativas, a fim de corrigir possíveis erros da técnica, encontrou-se uma equivalência adequada entre antígeno-anticorpo (Ag-Ac), com a diluição do anti-soro na proporção de 1:50 na solução de agarose a 1% e diluição das amostras de soro na proporção de 1:40 em água Mili-Q. Tais diluições tornaram os testes sensíveis para determinar concentrações de IgG a partir de 100 mg/dL.

Através desta técnica foi observado no soro dos potros valor menor que 100 mg/dL de IgG ao nascer e máximo de 2.653 mg/dL de IgG em 12 horas. Os valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão obtidos em cada tempo estão apresentados na Tabela 1. Não ocorreram oscilações individuais e os níveis foram crescentes a partir do nascimento até atingir seu valor máximo, com posterior redução até os 30 dias após o parto. A média no tempo T4 (24 horas) foi de 1.981 mg/dL, valor este superior ao relatado por Chaffin & Cohen (1998), que é de 1.600 mg/dL. Neste tempo houve variação dos valores mínimos e máximos de imunoglobulinas, que variaram de 1.508 a 2.570 mg/dL, respectivamente, sendo os valores mínimos diferentes dos relatados por Morris et al. (1985) que foram de 112 a 2.948 mg/dL.

TABELA 1 - Valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão (mg/dL) de imunoglobulina G no soro dos potros nos tempos T1 (momento do parto), T2 (6 horas pós-parto), T3 (12 horas pós-parto), T4 (24 horas pós-parto), T5 (48 horas pós-parto) e T6 (30 dias pós-parto), determinados por imunodifusão radial simples.

<i>Tempos</i>	<i>Valores (mg/dL)</i>		<i>Média±Desvio</i>
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	
T1	<100	<100	<100 ± 0 c
T2	<100	2.213	1.573,18 ± 604 b
T3	1.096	2.653	2.016,65 ± 412 a
T4	1.508	2.570	1.981,06 ± 380 ab
T5	1.253	2.625	2.036,59 ± 307 a
T6	1.098	2.213	1.762,71 ± 334 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

O momento de maior valor na concentração de IgG ocorreu em 17,64% (N=3) dos animais no tempo T3 (12 horas); em 17,64% (N=3) no T4 (24 horas) e em 64,7% (N=11) no T5 (48 horas). O valor médio mais alto (2.036,59 mg/dL) ocorreu no tempo T5 (48 horas) diferentemente do mencionado por Jeffcott (1974) e Koterba et al. (1990) que relatam valores máximos em 18 horas.

As médias para cada tempo, quando comparadas pelo método de Tukey 5%, apresentaram diferença significativa entre os tempos T1 e os demais tempos (Tabela 1). Não havendo diferença estatisticamente significativa entre os tempos T2, T4, e T6 e entre os tempos T3, T4, T5 e T6, podendo ser indicada a coleta de soro a partir de 12 horas após o parto, para a verificação da imunidade passiva.

Um achado durante a realização dos exames de IDRS até alcançar a proporção adequada entre antígeno-anticorpo, foi a formação de halos de precipitação em algumas amostras de soro dos potros no tempo T1 (momento do parto), indicando que nasceram hipogamaglobulinêmicos e não agamaglobulinêmicos, resultado também encontrado por Feitosa et al. (2001) em bezerros, mas ainda discutido entre pesquisadores. Pelas diluições utilizadas, as amostras no tempo T1 foram consideradas com níveis inferiores a 10 mg/dL e não com ausência total de imunoglobulinas.

Assim como relatado por Jeffcott (1974) e Koterba et al. (1990), imunoglobulinas puderam ser detectadas no soro dos neonatos 6 horas após ingestão do colostro, o que ocorreu em 16 animais (94,12%). Apenas um potro ainda não havia atingido níveis de IgG acima de 100 mg/dL neste período.

### **3.5.2. Turbidez pelo sulfato de zinco (TSZ)**

O teste de turvação pelo sulfato de zinco mostrou-se de fácil realização e interpretação, oferecendo um resultado em pouco tempo em concordância com Silva et al. (1988) e Koterba et al. (1990).

Os valores mínimos e máximos de IgG determinados pela espectrofotometria da técnica de turbidez pelo sulfato de zinco foram de 729,70 mg/dL a 2.312,70 mg/dL, com média de 1.538,10 mg/dL. Os valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão obtidos em cada tempo estão apresentados na Tabela 2.

O momento de maior valor na concentração de IgG ocorreu em 17,64% (N=3) dos animais no tempo T3 (12 horas); em 5,88% (N=1) no T4 (24 horas); em 64,7% (N=11) no

T5 (48 horas) e em 11,76% (N=2) no T6. O valor médio mais alto (1.874,59 mg/dL) ocorreu no tempo T5 (48 horas).

TABELA 2 - Valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão (mg/dL) no soro dos potros nos tempos T1 (momento do parto), T2 (6 horas pós-parto), T3 (12 horas pós-parto), T4 (24 horas pós-parto), T5 (48 horas pós-parto) e T6 (30 dias pós-parto) determinados por leitura da TSZ por espectrofotometria.

<i>Tempos</i>	<i>Valores (mg/dL)</i>		<i>Média±Desvio</i>
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	
T1	729,70	1.345,40	848,00 ± 173 c
T2	848,70	2.126,20	1.389,00 ± 402 b
T3	867,90	2.156,10	1.737,00 ± 366 a
T4	938,50	2.312,70	1.624,00 ± 401 ab
T5	827,90	2.189,80	1.874,00 ± 339 a
T6	1.473,60	2.146,10	1.715,00 ± 198 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

O teste de comparação entre médias demonstrou não haver diferença entre os tempos T3, T4, T5 e T6 (Tabela 2), exatamente igual à técnica de IDRS, evidenciando o comportamento similar dos métodos. Portanto, da mesma forma que observado para a técnica de IDRS, a determinação de IgG por TSZ está indicada a partir das 12 horas de pós-parto. Segundo Silva et al. (1988), a técnica não é indicada para momentos iniciais por resultados falso-negativos de FTP provenientes de reações inespecíficas.

Apesar da diferença de sensibilidade existente entre TSZ e IDRS (Feitosa et al., 2001), a técnica de turbidez pelo sulfato de zinco permitiu a obtenção de resultados de forma mais rápida. Observou-se correlação positiva ( $r = 0,96$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 2) entre TSZ e IDRS superior a encontrada por Rumbough et al. (1979), que obtiveram valores de  $r = 0,88$  ( $p < 0,001$ ).

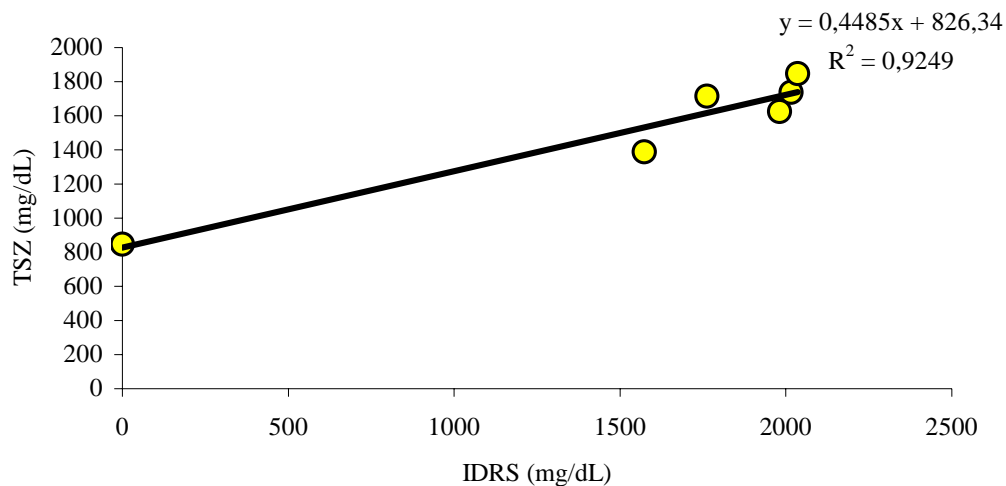


FIGURA 2 - Representação gráfica da dispersão dos valores de IgG obtidos por IDRS e TSZ em mg/dL.

O método do TSZ apresentou coeficiente de variação de 30,3%, bem menor que o obtido por IDRS, que foi de 52,3%, o que indica melhor reprodutibilidade dos resultados pela turbidez.

### **3.6. CONCLUSÕES**

1. O tempo indicado para coleta de sangue para determinação da concentração de IgG, tanto pela IDRS quanto pela TSZ, é de 12 horas após o nascimento.
2. Existe equivalência entre a concentração de IgG em mg/dL obtida pela IDRS e pelo método TSZ.
3. Na determinação da concentração sérica de IgG em neonatos eqüinos, o método do TSZ tem melhor reprodutibilidade que a IDRS.

### 3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESSI, R. **Estudo da absorção de anticorpos do colostro em bezerros recém-nascidos.** Piracicaba: ESALQ/USP, 2001. Dissertação (doutorado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 2001. 58p.

CHAFFIN, M.K., COHEN, N.D. Randomized controlled trial of effects of *Escherichia coli* antiserum on serum immunoglobulin G concentrations and morbidity and mortality rates in foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.212, n.11, p.1746-1750, 1998.

FEITOSA, F.L.F. Importância da transferência da imunidade passiva para a sobrevivência de bezerros neonatos. **Revista de Educação Continuada - CRMV-SP**, v.2, n.3, p.17-22, 1999.

FEITOSA, F.L.F., BIRGEL, E.H., MIRANDOLA, R.M.S. et al. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gama glutamil transferase no soro sanguíneo. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.251-255, 2001.

JEFFCOT, L.B. Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. **Equine Veterinary Journal**, v.6, n.3, p.109-115, 1974.

KOTERBA, A.M.; DRUMOND, W.H.; KOSCH, P.C. **Equine clinical neonatology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. 846p.

MANCINI, G., CARBONARA, A.O., HEREMANS, J.F. Imunochemical quantitation of antigens by single radial immunodifusion. **Imunochemistry**, v.2, n.3, p.235-254, 1965.

McCLURE, J.T.; MILLER, J.; DeLUCA, J.L. **Comparison of two ELISA screening tests and a non-commercial glutaraldehyde coagulation screening test for the detection of failure of passive transfer in neonatal foals**, 2003. Capturado em 25 de outubro de 2004. Online. Disponível na Internet: <http://www.ivis.org>.

McGOWAN, C.M.T.; HODGSON, J.L.; HODGSON, D.R. Failure of passive transfer in foals: incidence and outcome on four studs in new south wales. **Australian Veterinary Journal**, v.75, n.1, p.56-59, 1997.

McGUIRE, T.C.; CRAWFORD, T.B.; HALLOWELL, A.L. et al. Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.170, n.11, p.1302-1304, 1977.

McGUIRE, T.C.; POPPIE, M.J.; BANKS, K.L. Hypogammaglobulinemia predisposing to infections in foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.166, n.71, p.1138-1140, 1975.

MELLOR, D.J.; STAFFORD, K.J. Animal welfare implications of neonatal mortality and morbidity in farm animals. **The Veterinary Journal**, v.168, n.15, p.118-133, 2004.

MORRIS, D.D.; MEIRS, D.A.; MERRYMAN, G.S. Passive transfer failure in horses: incidence and causative factors on a breeding farm. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.11, p.2294-2297, 1985.

PARISH, S.M. Ruminant immunodeficiency diseases. In: SMITH, B.P. (Ed). **Large animal internal medicine**. 2<sup>nd</sup> ed. St.Louis: Mosby, 1996. p.1857-1860.

PAUL, W.E. **Fundamental immunology**, 3<sup>rd</sup> ed. New York: Raven Press, 1993. 1490p.

PAULETTI, P. **Efeito de diferentes níveis iniciais de imunoglobulinas adquiridas do colostro sobre a flutuação de proteínas séricas e desempenho de bezerras da raça holandesa**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 1999. 104p.

PFEIFFER, N.E., McGUIRE, T.C., BENDEL, R.B. Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.5, p.693-698, 1977.

RAIDAL, S.L. The incidence and consequences of failure of passive transfer of immunity on a Thoroughbred breeding farm. **Australian Veterinary Journal**, v.73, n.6, p.201-206, 1996.

RIDDLE, W.T. **Preparation of the mare for normal parturition**. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 49, 2003. Capturado em 26 de outubro de 2004. Online. Disponível na Internet: [www.ivis.org](http://www.ivis.org).

RUMBAUGH, G.E.; ARDANS, A.A.; GINNO, D. et al. Identification and treatment of colostrum-deficient foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.174, n.3, p.273-276, 1979.

SILVA, C.A.M.; RUBIN; M.I.B; WEIHRICH, F.L.; PELEGRINI, J.L.M. Diagnóstico da imunidade passiva adotiva adquirida através do colostro no potro recém-nascido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.4, n.1, p.11-15, 1984.

SILVA, C.A.M.; SILVA, J.F.S.; ALDA, J.L.; SILVA, J.H.S.; RUBIN; M.I.B. Diagnóstico imediato da imunodeficiência do potro recém-nascido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.12, n.4, p.203-212, 1988.

STONEHAM, S.J.; DIGBY, N.J.W.; RICKETTS, S.W. Failure of passive transfer of colostral immunity in the foal: incidence, and the effect of stud management and plasma transfusion. **The Veterinary Record**, v.128, p.416-419, 1991.

SUSIN, I. **Concentrações séricas de proteína total e imunoglobulinas, e desempenho de bezerros submetidos a diferentes regimes de aleitamento e épocas de desmame**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1985. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 1985. 89p.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária**, 2 ed. São Paulo: Roca, 1985. 329p.

TOWNSEND, H.G.G.; TABEL, H.; BRISTOL, F.M. Induction of parturition in mares: effecton passive transfer of immunity to foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.182, n.3, p.255-257, 1983.

UFV - Universidade Federal de Viçosa. SAEG (2001). **Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 9.0 (manual do usuário). Viçosa, MG. 301p.

**4. CAPÍTULO 4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IgG NO SORO DE  
NEONATOS EQÜINOS PELOS MÉTODOS DE IMUNODIFUSÃO RADIAL  
SIMPLES E COAGULAÇÃO PELO GLUTARALDEÍDO**

**LANG, André; Universidade Federal de Viçosa.**

#### 4.1. RESUMO

LANG, André, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2006. “**Determinação da concentração de IgG no soro de neonatos eqüinos pelos métodos de imunodifusão radial simples e coagulação pelo glutaraldeído**”. Orientadora: Maria Verônica de Souza. Co-Orientadores: José Dantas Ribeiro Filho e Luiz Gonzaga Pompermeyer.

O objetivo deste trabalho foi comparar a concentração de IgG no soro de neonatos eqüinos pelas técnicas de imunodifusão radial simples (IDRS) e coagulação pelo glutaraldeído (CG). Para isso foram utilizados 17 neonatos, mestiços da raça Bretão. Os partos foram acompanhados e amostras de sangue foram coletadas dos potros logo após o parto, assim como com 6, 12, 24, 48 horas e 30 dias após o mesmo. As amostras foram processadas e a concentração de IgG estimada no soro por IDRS e CG. Valores máximos de IgG foram encontrados com 48 horas após o parto, tanto quando se utilizou a técnica de IDRS como a CG. A comparação dos valores médios de IgG obtidos em cada tempo indicou o período de 12 horas após o parto como o tempo ideal para a determinação da concentração de IgG pela técnica de IDRS e de 6 horas para a técnica de CG. Correlação significativa foi observada entre a concentração de IgG obtida no soro dos potros pela técnica de IDRS com a encontrada utilizando-se o método de CG.

**Palavras-chave:** Imunidade passiva, IDRS, glutaraldeído.

## 4.2. ABSTRACT

LANG, André, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2006. “**Determination of IgG concentration in newborn foals serum by the single radial immunodifusion and glutaraldehyde coagulation**”. Adviser: Maria Verônica de Souza. Co-Advisers: José Dantas Ribeiro Filho and Luiz Gonzaga Pompermeyer.

The objective of this work was to compare IgG concentrations in the serum of newborn foals by applying single radial immunodiffusion techniques (SRID) and the glutaraldehyde coagulation (GC) test. Thus, 17 Breton cross breed animals were used. Birth was monitored and blood samples collected from the foals immediately after and at 6, 12, 24, 48 h and 30 days after birth. The samples were processed and IgG concentration estimated in the serum by SRID and GC test. Maximum IgG values were found 48 h after birth, both for SRID and GC test. The comparison of the mean IgG values obtained each time indicated a period of 12 h after birth as the ideal time for determining IgG concentration by the SRID technique and of 6 h using the GC test. A significant correlation was observed between IgG concentration obtained in the foal serum by the SRID technique with that found using GC test.

**Key-words:** Passive immunity, SRID, glutaraldehyde.

### 4.3. INTRODUÇÃO

A ocorrência de infecções em eqüinos neonatos é reconhecida e justificada pelo tipo de placenta que oferece uma barreira à passagem de anticorpos para os fetos durante a gestação, e pelo fato da transferência de imunidade passiva ser dependente da ingestão e absorção de colostro.

Como a mais freqüente causa de óbito de potros nas duas primeiras semanas de vida ocorre por doenças infecciosas, é importante conhecer o estado imunológico do neonato o mais precoce possível, para minimizar prejuízos econômicos. Aspectos como tipo de placenta, qualidade do colostro, assistência ao parto e ambiente interferem de forma direta na transferência de imunidade passiva.

Dentre as formas de avaliação da transferência de imunidade passiva, a determinação da concentração de imunoglobulinas G é a principal.

A placenta do tipo epiteliocorial difusa da égua apresenta seis camadas teciduais entre a circulação sangüínea materna e fetal, compreendendo o endotélio capilar materno, tecido conjuntivo uterino, epitélio uterino, epitélio coriônico, tecido conjuntivo fetal e endotélio capilar fetal, que promovem uma barreira para a transferência transplacentária de anticorpos. Por esta razão, os potros nascem hipo ou agamaglobulinêmicos (Jeffcott, 1974; Tizard, 1985; Feitosa et al., 2001).

O colostro é a primeira secreção láctea por ocasião do parto, constituído de leite e elementos do soro sangüíneo como as imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G (Tizard, 1985; Parish, 1996). O mecanismo seletivo pelo qual ocorre a transferência de

IgG do sangue para a glândula mamária envolve um conjunto de fatores como receptores na membrana basal ou intercelular da célula acinar epitelial e controle hormonal na síntese e transporte de imunoglobulinas (Pauletti, 1999; Bessi, 2001).

As imunoglobulinas ativam a cascata de complemento pela via clássica, e se aderem à superfície de antígenos para fagocitose por macrófagos, granulócitos, linfócitos ou células “Natural Killers” (Paul, 1993).

Segundo Tizard (1985), os níveis séricos de imunoglobulinas em equinos adultos hígidos são de 500 a 2000 mg/dL de IgG, 80 a 200 mg/dL de IgM, 60 a 350 mg/dL de IgA e 100 a 1.500 mg/dL de IgGt.

A concentração mínima de IgG necessária para proteção do potro contra infecções dependem de fatores inerentes aos patógenos presentes no meio ambiente, fatores relacionados ao manejo, e ao estresse (McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979, Koterba et al., 1990; Feitosa, 1999).

Diversos estudos demonstram que potros com falha total na transferência de imunidade passiva têm concentração sérica de IgG inferior a 200 mg/dL já quando a falha é parcial, os valores podem variar entre 200 a 400 mg/dL, sendo considerado aceitável acima de 800 mg/dL (Rumbaugh et al., 1979; Parish, 1996; Mellor & Stafford, 2004).

Índices de mortalidade podem atingir 10-12% em espécies uníparas, principalmente em casos de predação e quando não há suporte humano adequado (Mellor & Stafford, 2004). A incidência de falha na transferência de imunidade passiva tem sido estimada em 2,9 a 25%, sendo dependente do desafio ao qual o neonato está exposto (McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979).

Existe relação inversamente proporcional entre níveis séricos de IgG e infecções neonatais, havendo uma incidência de infecção e mortalidade significativamente maior em potros com níveis séricos de IgG inferiores a 400 mg/dL (McGuire et al., 1975; Riddle, 2003).

Um estudo realizado por Raidal (1996), para a determinação da concentração de IgG em 323 potros neonatos, utilizando o método de imunodifusão radial simples (IDRS), revelou que 1,9% (N=6) dos animais apresentaram concentrações de IgG < 400 mg/dL, 5% (N=16) IgG ≤ 400 mg/dL e 9,6% (N=31) IgG < 800 mg/dL. Níveis de IgG < 800 mg/dL nas primeiras 24 horas de vida estiveram associados de forma significativa a um aumento na incidência de doenças infecciosas perinatais.

Uma pesquisa realizada por McGuire et al. (1977) em 62 potros provenientes de um mesmo criatório, com a finalidade de determinar a concentração de IgG no soro pela técnica de imunodifusão radial simples demonstrou que 6 animais (9,7%) apresentavam menos de 200 mg/dL de IgG, mesmo após ingerirem colostro por mais de 24 horas. Quatro dos seis potros apresentaram problemas durante as primeiras duas semanas de vida, incluindo diarreia, pneumonia e infecção do trato respiratório superior. A falha na transferência de imunidade passiva foi atribuída à incapacidade de ingestão do colostro pelo potro (N=1), apesar da assistência realizada nas primeiras 24 horas, assim como pela baixa concentração de IgG (N=2) no leite materno. Em três animais, a causa não foi determinada. Em outra propriedade, 12% de 25 neonatos apresentaram concentração de IgG menor que 200 mg/dL e todos manifestaram diarreia e/ou pneumonia. Segundo os autores, falha parcial ocorreu em 16,1% na primeira propriedade, e apenas dois animais manifestaram quadro de infecção discreta, sendo um após 60 dias. Na segunda propriedade a falha parcial atingiu dois animais dos qual um desenvolveu artrite e posteriormente veio a óbito. Dos potros com transferência adequada de imunidade passiva, 74,2% na primeira propriedade e 80% na segunda, não apresentaram quadro de infecção.

Townsend et al. (1983) utilizaram prostaglandina sintética na dose de 10 mg via intramuscular para indução de parto, e determinaram por imunodifusão radial simples, a concentração de IgG no soro dos potros neonatos. Os autores constataram concentrações de IgG inferiores às das éguas, tanto no grupo tratado como no controle. Adicionalmente, quatro dos onze potros nascidos de parto induzido morreram ou foram submetidos à eutanásia por apresentarem quadro de fraqueza extrema. A concentração média de IgG no colostro das éguas tratadas foi de 6.438 mg/dL, variando de 3.600 a 10.250 mg/dL, excedendo assim, o valor mínimo recomendado que é de 1000 mg/dL de IgG. Como não houve caso de lactação prematura ou atraso na ingestão do colostro, foi cogitada a produção inadequada de colostro como a causa da redução dos níveis de IgG no soro dos neonatos.

Buscando aumentar a imunidade do neonato, Chaffin & Cohen (1998), utilizaram antisoro comercial para *Escherichi coli*. Entretanto, os autores não encontraram diferença significativa entre o grupo tratado e o controle quanto à concentração sérica de IgG determinada por imunodifusão radial simples, sendo verificada uma média de 1600 mg/dL de concentração dessa imunoglobulina em ambos os grupos. Dos 137 animais do grupo tratado, 12 (8,8%) apresentaram FPTP e 6 (4,4%) FTP; já no grupo controle, dos 131

animais avaliados, 8 (6,1%) apresentou FPTP e 3 (2,3%) FTP. De 61 potros que adoeceram, 48 tiveram doença infecciosa, mas não diferiram significativamente entre os grupos tratados e controle. As doenças infecciosas incluíram: infecção do trato respiratório superior, gastrointestinal e/ou urogenital, artrite séptica, quadro dermatológico e septicemia. Doenças não infecciosas também foram relatadas, como deformidade músculo-esquelética congênita, afecção músculo-esquelética traumática, ulceração gástrica, persistência do úraco, doença neurológica, além de outros problemas sem diagnóstico definitivo.

Conforme resultados encontrados por Morris et al. (1985), mediante a utilização de imunodifusão radial simples, em amostras de soro de equinos coletadas entre 24 e 36 horas após o parto, a concentração de IgG variou entre 112 a 2.948 mg/dL e, apenas 2,9% (4 de 136 amostras), desenvolveram falha na transferência de imunidade passiva. Das quatro éguas que tiveram potros com falha na imunidade passiva, 50% apresentaram lactação prematura. Correlação positiva ( $r=0,58$ ;  $p<0,001$ ) foi observada entre a concentração de IgG no colostro e soro dos potros. Concentração inferior a 1.000 mg/dL foi observada no colostro de duas éguas que apresentaram lactação prematura e seus potros apresentaram concentração de IgG inferior a 500 mg/dL. Os autores encontraram ainda significativa relação entre os testes de imunodifusão radial simples, turbidez por sulfato de zinco e aglutinação em látex.

Clabough et al. (1991), determinaram a concentração de IgG no soro de 361 neonatos 24 a 36 horas após o parto, utilizando o teste de coagulação por glutaraldeído e encontraram uma prevalência de 18% (N=65) de FTP. Os autores consideraram falha na transferência passiva, quando a concentração de IgG foi inferior a 400 mg/dL. Dos 65 potros com FTP, 35,4% precisaram de assistência clínica até os três meses de idade. Fatores como idade das éguas, número de partos, retenção e peso da placenta, tempo de gestação, ocorrência de distorcia e a época do ano em que os potros nasceram foram avaliadas com a finalidade de determinar predisposição à falha na transferência passiva. A exceção da época em que ocorreram os partos (quando houve menos casos de FTP no final do inverno, sendo considerado fisiológico devido à época de cobertura das éguas), não houve associação entre FTP e os aspectos avaliados. Os potros com FTP apresentaram menor desenvolvimento com relação a idade gestacional, deformidades do esqueleto apendicular e vigor reduzido.

Os métodos disponíveis para avaliação dos níveis séricos de imunoglobulinas incluem os indiretos (refratometria, turbidez pelo sulfato de zinco, coagulação por glutaraldeído, aglutinação no látex) e diretos (eletroforese, imunodifusão radial simples e elisa).

Um método que produz alguns resultados falso-positivos tem maior especificidade, já quando produz alguns resultados falso-negativos tem maior sensibilidade. O ideal é que a técnica tenha alta sensibilidade e especificidade, como é o caso da imunodifusão radial simples. Infelizmente esta técnica leva de 18 a 24 horas para se obter os resultados, além de exigir maiores recursos laboratoriais. Em contraste, existem testes mais simples e rápidos. Nesse sentido, o ideal é que ele possua maior sensibilidade para minimizar as falhas na classificação de potros imunodeficientes. Sendo assim, o teste de coagulação por glutaraldeído é tido como de sensibilidade relativamente alta, entretanto deve ser utilizado em conjunto com um segundo teste confirmatório (McClure et al., 2003).

A imunodifusão radial simples é baseada no teste de anti-soro específico contido em matriz de gel reagindo com o soro do paciente. O tamanho dos anéis de precipitação produzidos pela difusão do soro testado é comparado com padrões conhecidos, dando informação de classe e subclasse de imunoglobulina específica (Mancini et al., 1965; Rumbaugh et al., 1979). Apesar de ser considerado o teste de escolha para a determinação de FTP, a não disposição imediata dos resultados, o alto custo e a dependência de equipamentos limita a aplicação desta técnica (Pfeiffer et al., 1977; Feitosa et al., 2001).

O glutaraldeído em solução a 10% é capaz de coagular as imunoglobulinas séricas quando estas se encontram em concentrações superiores a 600 mg/dL em diferentes períodos de tempo (Clabough et al., 1991; Parish, 1996). Segundo McGowan et al (1997), quando aparecem coágulos em menos de 10 minutos, se considerada que houve transferência adequada de imunoglobulinas; quando entre 10 e 60 minutos, a falha é parcial e quando superior a 60 minutos, há realmente falha na transferência de imunidade passiva.

O objetivo deste trabalho foi comparar a concentração de IgG no soro de neonatos eqüinos pelas técnicas de imunodifusão radial simples e coagulação pelo glutaraldeído.

#### 4.4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 17 potros neonatos mestiços da raça Bretão, pertencentes ao Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As éguas progenitoras, com idade média de 12 anos, permaneceram durante o período de gestação em piquetes com grama estrela (*Cynodon dactylon*) e capim gordura (*Melinis munitiflora*), sendo oferecido também, capim elefante (*Pennisetum purpureum Schum*) picado e concentrado nos meses em que a forragem era mais escassa. Adicionalmente, recebiam sal mineral e a água era proveniente de açudes artificiais e bebedouros.

Os animais possuíam pequena diferença com relação ao grau de sangue, mas apresentavam condições nutricionais e higiênico-sanitárias homogêneas.

Conforme a proximidade do parto, determinada pela data de cobertura, aumento da glândula mamária, relaxamento dos ligamentos pélvicos, as éguas foram separadas em piquetes maternidade, de aproximadamente 1000 m<sup>2</sup>, com pequena área coberta, cocho, bebedouro e relevo ligeiramente inclinado, para maior segurança nos momentos do parto.

##### 4.4.1. Coleta das amostras

Todos os partos foram acompanhados à distância e amostras de 10 mL de sangue foram coletadas em tubos a vácuo sem anticoagulante, por venipunção jugular.

A coleta das amostras foi realizada em seis tempos: T1 = logo após o nascimento, T2 = 6 horas, T3 = 12 horas, T4 = 24 horas, T5 = 48 horas e T6 = 30 dias, após a primeira mamada.

Após sedimentação em temperatura ambiente e centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos, amostras de soro foram separadas, identificadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de realização das análises.

Todas as coletas foram realizadas por médico veterinário, após exame físico dos animais, e de forma a causar o mínimo de estresse ou interferência na interação entre égua e potro.

#### **4.4.2. Imunodifusão radial simples (IDRS)**

Para a realização da técnica, modificada de Mancini et al. (1965), inicialmente se obteve anticorpos anti-IgG eqüina de coelhos, mediante a realização de quatro inoculações seriadas (via subcutânea, em intervalos de quinze dias), de IgG eqüina em solução 1:1 de salina 0,9% e adjuvante completo de Freund, para a primeira inoculação e incompleto para as demais.

Na primeira, terceira e quarta inoculações utilizou-se 1 mg de IgG eqüina em 800  $\mu\text{L}$  do adjuvante e, na segunda inoculação, utilizou-se 2 mg de IgG eqüina em 400  $\mu\text{L}$  da solução. Sete dias após a quarta inoculação observou-se, por imunodifusão radial dupla com IgG eqüina e soro de coelho inoculado, titulação adequada. Os coelhos foram então sacrificados para obtenção de soro hiperimune.

O soro proveniente dos coelhos foi diluído em agarose a 1% em salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,2, na proporção 1:50, para preparação de placas de poliestireno (cultivo celular).

Após polimerização em temperatura ambiente, foram realizados orifícios de aproximadamente 2,5 mm, para a deposição de soluções contendo concentração conhecida de IgG eqüina e das amostras de soro diluídas na proporção 1:40 em água Mili-Q. As medidas dos anéis formados por precipitação nas amostras conhecidas foram utilizados para estabelecer uma regressão linear e posterior quantificação em mg/dL das amostras testadas.

#### **4.4.3. Coagulação pelo glutaraldeído (CG)**

A técnica de coagulação pelo glutaraldeído foi realizada conforme apresentada por Clabough et al. (1991), Parish (1996) e McGowan et al. (1997).

Para a realização deste exame, 50 µL de uma solução de glutaraldeído a 10% foi adicionado a 0,5 mL da amostra de soro, sendo analisado o binômio tempo-coagulação. Quando se tornou possível inclinar os tubos a aproximadamente 90°, sem que o conteúdo escorresse, se considerou que a coagulação foi completa e o tempo foi registrado em minutos.

#### **4.4.4. Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa SAEG, versão 9.0 (UFV, 2001). Inicialmente foi realizada a estatística descritiva dos dados e, subseqüentemente, a análise de variância (ANOVA) e teste de média Tukey ( $p < 0,05$ ), para se avaliar a similaridade ou não dos valores de tempo de coagulação do soro pela técnica de CG e concentração de IgG obtida por IDRS, ao longo do tempo.

Correlação e coeficiente de variação foram usados para comparação entre os testes pela técnica de CG e o teste-padrão (IDRS) para verificação da confiabilidade.

## **4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O acompanhamento dos partos à distância não provocou prejuízo aos mesmos. Com a contenção adequada dos animais, a coleta das amostras foi facilmente realizada, não ocorrendo danos ou interferência na interação égua-potro.

### **4.5.1. Imunodifusão radial simples (IDRS)**

Apesar da eficácia do método de imunodifusão radial simples, sabe-se que o seu custo é elevado, já que as placas de gel sensibilizadas com anticorpos contra imunoglobulinas de eqüinos não são produzidas no Brasil. Neste sentido, o processamento das amostras só é possível mediante a importação desse material ou produção própria, conforme utilizado neste estudo, o que exige tempo e custo inviáveis em pequena escala. O tempo gasto para realização da imunodifusão radial e apresentação dos resultados é outro fator limitante para seu uso no diagnóstico precoce de falha na transferência de imunidade passiva em potros, pois as leituras só podem ser realizadas a partir de 24 horas após a aplicação das amostras de soro nas placas, o que compromete a assistência clínica aos animais com hipogamaglobulinemia como destacado por vários autores (Jeffcott, 1974; McGuire et al., 1977; Rumbaugh et al., 1979; Koterba et al., 1990; Stoneham et al., 1991; Parish, 1996; McGowan et al., 1997; Mellor & Stafford, 2004).

Quando não se utiliza kit comercial, diversas diluições devem ser testadas, tanto do anti-soro quanto das amostras, para se atingir uma equivalência adequada à formação dos anéis de precipitado e evitar a ocorrência de erros, observados em amostras de grandes

concentrações de imunoglobulina G, como reportado por Pfeiffer et al. (1977) e Feitosa et al. (2001). Neste estudo, diversas diluições foram testadas sem que ocorresse a formação dos anéis característicos. Após várias tentativas, a fim de corrigir possíveis erros da técnica, encontrou-se uma equivalência adequada entre antígeno-anticorpo (Ag-Ac), com a diluição do anti-soro na proporção de 1:50 na solução de agarose a 1% e diluição das amostras de soro na proporção 1:40 em água Mili-Q.

No soro dos potros foi observado um valor mínimo e máximo <100 mg/dL de IgG ao nascer e de zero e 2653 mg/dL de IgG em 12 horas, respectivamente. Os valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão obtidos em cada tempo estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão (mg/dL) de imunoglobulina G no soro dos potros nos tempos T1 (momento do parto), T2 (6 horas pós-parto), T3 (12 horas pós-parto), T4 (24 horas pós-parto), T5 (48 horas pós-parto) e T6 (30 dias pós-parto), determinados por imunodifusão radial simples.

<i>Tempos</i>	<i>Valores (mg/dL)</i>		<i>Média±Desvio</i>
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	
T1	<100	<100	<100 ± 0 c
T2	<100	2.213	1.573,18 ± 604 b
T3	1.096	2.653	2.016,65 ± 412 a
T4	1.508	2.570	1.981,06 ± 380 ab
T5	1.253	2.625	2.036,59 ± 307 a
T6	1.098	2.213	1.762,71 ± 334 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

Os níveis foram crescentes a partir do nascimento até atingir um valor máximo, com posterior redução até os 30 dias após o parto. O valor médio no tempo T4 (24 horas) foi de 1.981 mg/dL, sendo superior ao relatado por Chaffin & Cohen (1998), que é de 1.600 mg/dL.

O momento de maior valor da concentração de IgG ocorreu em 17,64% (N=3) dos animais no tempo T3 (12 horas); em 17,64% (N=3) no T4 (24 horas) e em 64,7% (N=11)

no T5 (48 horas). O valor médio mais alto (2.036,59 mg/dL) ocorreu no tempo T5 (48 horas) diferentemente do mencionado por Jeffcott (1974) e Koterba et al. (1990), que relatam valores máximos em 18 horas. Adicionalmente, conforme estes autores, os valores por eles obtidos foram muito próximos aos maternos, sendo que em 41,17% dos potros do presente estudo (N=7), foram ainda superiores.

As médias para cada tempo, quando comparadas pelo método de Tukey 5%, apresentaram diferença significativa entre os tempos T1 e os demais tempos (Tabela 1). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos T2, T4, e T6 e entre os tempos T3, T4, T5 e T6, podendo ser indicada a coleta de soro a partir de 12 horas após o parto, para a verificação da imunidade passiva.

Um achado durante a realização dos exames de IDRS até alcançar a proporção adequada entre antígeno-anticorpo, foi a formação de halos de precipitação em algumas amostras de soro dos potros no tempo T1 (momento do parto), indicando que nasceram hipogamaglobulinêmicos e não agamaglobulinêmicos, resultado também encontrado por Feitosa et al. (2001) em bezerros, mas ainda discutido entre pesquisadores. Pelas diluições utilizadas, as amostras no tempo T1 foram consideradas com níveis inferiores a 10 mg/dL e não com ausência total de imunoglobulinas.

Assim como relatado por Jeffcott (1974) e Koterba et al. (1990), imunoglobulinas puderam ser detectadas no soro dos neonatos 6 horas após ingestão do colostro, o que ocorreu em 16 animais (94,12%). O outro potro ainda não havia atingido níveis adequados de IgG neste período.

#### **4.5.2. Coagulação pelo glutaraldeído**

A técnica de coagulação pelo glutaraldeído, para a determinação da concentração de IgG, mostrou-se ser de fácil execução e com baixo custo, além de rapidamente realizada.

Quanto menor o tempo de coagulação do soro pelo glutaraldeído, maior a concentração de IgG estimada. Neste estudo, o tempo mínimo necessário para a completa coagulação do soro pelo glutaraldeído foi de 2 minutos. Quando não houve coagulação o resultado foi considerado negativo. O maior tempo obtido em resultado positivo foi de 15 minutos e a média dos resultados positivos foi de 3,04 minutos. Os valores mínimos e máximos, assim como a média e o desvio-padrão obtidos em cada tempo estão apresentados na Tabela 2.

O momento de mais rápida coagulação do soro do neonato pelo glutaraldeído, ocorreu em 64,7% (N=11) dos animais no tempo T2 (6 horas); em 23,53% (N=4) no T3 (12 horas); em 5,88% (N=4) no T4 (24 horas) e em 5,88% (N=1) no T5 (48 horas).

Diferença significativa foi observada entre os valores médios obtidos no tempo T1 e os demais tempos, que não diferiram entre si (Tabela 2). Portanto, já às 6 horas após o parto está indicado a determinação da concentração de IgG pela técnica coagulação pelo glutaraldeído.

Considera-se como um tempo máximo de dez minutos para coagulação como o ideal para classificar como eficiente a transferência de imunidade passiva (Jeffcott, 1974; Koterba et al., 1990; Clabough et al., 1991). Baseado nos valores médios achados neste estudo pode-se afirmar que a amostra que coagula em cinco minutos, apresentam níveis de IgG acima de 1.500 mg/dL, quando confrontados com os resultados de IDRS.

TABELA 2 - Valores mínimos, máximos, médios e desvios-padrão (minutos) determinados pelo método de coagulação pelo glutaraldeído no soro dos potros nos tempos T1 (momento do parto), T2 (6 horas pós-parto), T3 (12 horas pós-parto), T4 (24 horas pós-parto), T5 (48 horas pós-parto) e T6 (30 dias pós-parto).

<i>Tempos</i>	<i>Valores (min)</i>		<i>Média±Desvio</i>
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	
T1	NC	NC	NC <sup>a</sup>
T2	5	NC	2,83 ± 0,879 b
T3	2	15	3,26 ± 3,087 b
T4	2	4	2,56 ± 0,655 b
T5	2	4	2,50 ± 0,637 b
T6	2	10	4,02 ± 2,420 b

NC: não houve coagulação por mais de 60 minutos. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

Os valores de tempo necessários para a coagulação do soro pela técnica do CG apresentou correlação negativa (r=-0,89, p<0,0001), com os obtidos de IgG por IDRS (Figura 1), indicando haver uma relação inversa entre os resultados alcançados entre essas duas técnicas de determinação.

O coeficiente de variação obtido para os resultados de CG (62,8%) foi superior ao da IDRS (52,3%).

Para ilustração gráfica dos resultados de CG utilizou-se o tempo de 100 minutos apenas para evidenciar a diferença das amostras que não coagularam em tempo superior a 60 minutos e as demais.

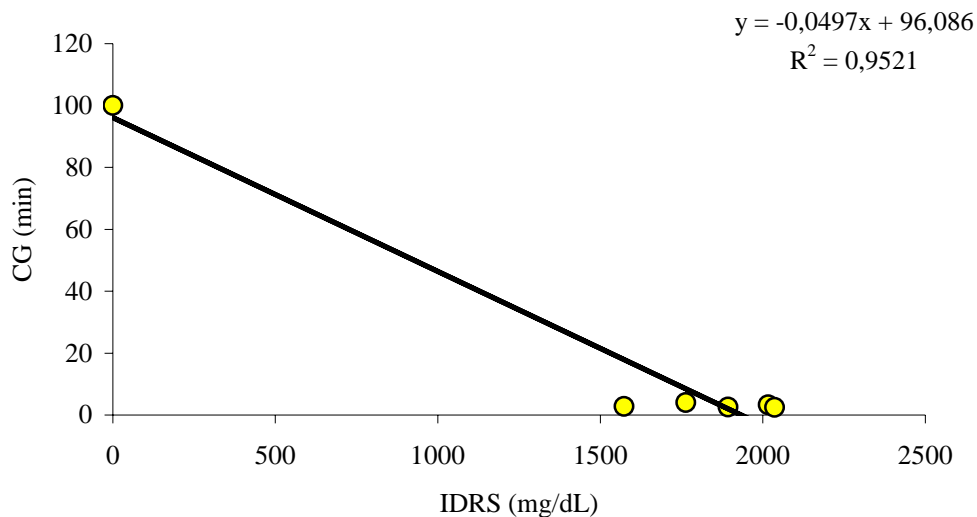


FIGURA 1 - Representação gráfica da dispersão dos valores de IgG obtidos por IDRS (mg/dL) e por CG (min).

#### **4.6. CONCLUSÕES**

1. O tempo indicado para coleta de sangue para estimativa da concentração de IgG no soro de neonatos eqüinos pelo método de CG é de 6 horas após o parto;
2. Existe equivalência entre a estimativa da concentração de IgG no soro de neonatos eqüinos, por IDRS e CG;
3. O método do CG para estimativa da concentração sérica de IgG em neonatos eqüinos, tem maior coeficiente de variação que a IDRS.

#### 4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESSI, R. **Estudo da absorção de anticorpos do colostro em bezerros recém-nascidos.** Piracicaba: ESALQ/USP, 2001. Dissertação (doutorado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 2001. 58p.

CHAFFIN, M.K., COHEN, N.D. Randomized controlled trial of effects of *Escherichia coli* antiserum on serum immunoglobulin G concentrations and morbidity and mortality rates in foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.212, n.11, p.1746-1750, 1998.

CLABOUGH D.L.; LEVINE J.F.; GRANT G.L. et al. Factors associated with failure of passive transfer of colostral antibodies in standardbred foals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.5, n.6, p.335-340, 1991.

FEITOSA, F.L.F. Importância da transferência da imunidade passiva para a sobrevivência de bezerros neonatos. **Revista de Educação Continuada - CRMV-SP**, v.2, n.3, p.17-22, 1999.

FEITOSA, F.L.F., BIRGEL, E.H., MIRANDOLA, R.M.S. et al. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e

de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gama glutamil transferase no soro sanguíneo. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.251-255, 2001.

JEFFCOT, L.B. Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. **Equine Veterinary Journal**, v.6, n.3, p.109-115, 1974.

KANEKO, II. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 4<sup>th</sup> ed. London: Academic Press Inc., 1989. 932p.

KOTERBA, A.M.; DRUMOND, W.H.; KOSCH, P.C. **Equine clinical neonatology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. 846 p.

MANCINI, G., CARBONARA, A.O., HEREMANS, J.F. Imunochemical quantitation of antigens by single radial immunodifusion. **Imunochemistry**, v.2, n.3, p.235-254, 1965.

McCLURE, J.T.; MILLER, J.; DeLUCA, J.L. **Comparison of two ELISA screening tests and a non-commercial glutaraldehyde coagulation screening test for the detection of failure of passive transfer in neonatal foals**, 2003. Capturado em 25 de outubro de 2004. Online. Disponível na Internet: <http://www.ivis.org>.

McGOWAN, C.M.T.; HODGSON, J.L.; HODGSON, D.R. Failure of passive transfer in foals: incidence and outcome on four studs in new south wales. **Australian Veterinary Journal**, v.75, n.1, p.56-59, 1997.

McGUIRE, T.C.; CRAWFORD, T.B.; HALLOWELL, A.L. et al. Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.170, n.11, p.1302-1304, 1977.

McGUIRE, T.C.; POPPIE, M.J.; BANKS, K.L. Hypogammaglobulinemia predisposing to infections in foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.166, n.71, p.1138-1140, 1975.

MELLOR, D.J.; STAFFORD, K.J. Animal welfare implications of neonatal mortality and morbidity in farm animals. **The Veterinary Journal**, v.168, n.15, p.118-133, 2004.

MORRIS, D.D.; MEIRS, D.A.; MERRYMAN, G.S. Passive transfer failure in horses: incidence and causative factors on a breeding farm. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.11, p.2294-2297, 1985.

PARISH, S.M. Ruminant immunodeficiency diseases. In: SMITH, B.P. (Ed). **Large animal internal medicine**. 2<sup>nd</sup> ed. St.Louis: Mosby, 1996. p.1857-1860.

PAUL, W.E. **Fundamental immunology**, 3<sup>rd</sup> ed. New York: Raven Press, 1993. 1490p.

PAULETTI, P. **Efeito de diferentes níveis iniciais de imunoglobulinas adquiridas do colostro sobre a flutuação de proteínas séricas e desempenho de bezerras da raça holandesa**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz – Universidade de São Paulo, 1999.104p.

PFEIFFER, N.E., McGUIRE, T.C., BENDEL, R.B. Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.5, p.693-698, 1977.

RAIDAL, S.L. The incidence and consequences of failure of passive transfer of immunity on a Thoroughbred breeding farm. **Australian Veterinary Journal**, v.73, n.6, p.201-206, 1996.

RIDDLE, W.T. **Preparation of the mare for normal parturition**. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 49, 2003. Capturado em 26 de outubro de 2004. Online. Disponível na Internet: [www.ivis.org](http://www.ivis.org).

RUMBAUGH, G.E.; ARDANS, A.A.; GINNO, D. et al. Identification and treatment of colostrum-deficient foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.174, n.3, p.273-276, 1979.

STONEHAM, S.J.; DIGBY, N.J.W.; RICKETTS, S.W. Failure of passive transfer of colostral immunity in the foal: incidence, and the effect of stud management and plasma transfusion. **The Veterinary Record**, v.128, p.416-419, 1991.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária**, 2 ed. São Paulo: Roca, 1985. 329p.

TOWNSEND, H.G.G.; TABEL, H.; BRISTOL, F.M. Induction of parturition in mares: effect on passive transfer of immunity to foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.182, n.3, p.255-257, 1983.

UFV - Universidade Federal de Viçosa. SAEG (2001). **Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 9.0 (manual do usuário). Viçosa, MG. 301p.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

1. Concentrações de IgG no colostro de éguas acima de 1.000 mg/dL, podem ser encontradas mesmo 48 horas após o parto.
2. Não existe equivalência entre a concentração de IgG no soro das éguas e respectivo colostro.
3. Existe equivalência entre a concentração de IgG no soro das éguas e concentração máxima dessa imunoglobulina no soro dos neonatos.
4. Existe correlação negativa entre as concentrações de IgG no colostro e soro de neonatos eqüinos no momento do parto, com 12 e 48 horas após o mesmo.
5. O tempo indicado para coleta de sangue para determinação da concentração de IgG, tanto pela IDRS quanto pela TSZ, é de 12 horas após o nascimento.
6. Existe equivalência entre a concentração de IgG em mg/dL obtida pela IDRS e pelo método TSZ.
7. Na determinação da concentração sérica de IgG em neonatos eqüinos, o método do TSZ tem melhor reprodutibilidade que a IDRS.
8. O tempo indicado para coleta de sangue para determinação da concentração de IgG no soro de neonatos eqüinos pelo método de CG é de 6 horas após o parto.
9. Existe equivalência entre a estimativa da concentração de IgG no soro de neonatos eqüinos, por IDRS e CG.