

# DIAGNÓSTICO DA IMUNIDADE PASSIVA ADOTIVA ADQUIRIDA ATRAVÉS DO COLOSTRO NO POTRO RECÉM-NASCIDO<sup>1</sup>

CARLOS ANTONIO MONDINO SILVA<sup>2</sup>, MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN<sup>3</sup>, FÁBIO LINCK WAIHRICH<sup>4</sup> E JOSÉ LUÍS MACHRY DE PELEGRINI<sup>4</sup>

ABSTRACT.- Silva C.A.M., Rubin M.I.B., Waihrich F.L. & Pelegrini J.L.M. 1983. [Diagnose of the adoptive passive immunity acquired through the colostrum in the newborn foal.] Diagnóstico da imunidade passiva adotiva adquirida através do colostro no potro recém-nascido. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 4(1):11-15. Depto Clínica de Grandes Animais, CCR, Univ. Fed. Sta Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97100, Brazil.

The sera of seventeen thoroughbred mares were examined at the time of parturition using the biuret reaction, eletrophoresis and zinc sulphate turbidity (ZST) in order to determine serum protein levels. The sera of their foals were sampled at zero, 1, 3, 6, 12, 24, 28, 72 and 96 hours after colostrum intake and submitted to the same tests as in the mare in order to determine diagnostic means to detect immunodeficiency states. A significant rise of the total serum protein ( $P < 0,0005$ ), gammaglobulins ( $P < 0,0001$ ) and ZST ( $P < 0,0001$ ) was observed in the foals serum since colostrum intake up to 96 hours. It was possible to detect both by eletrophoresis and ZST in the foals serum similar levels of Ig as in adults as soon as six hours after sucking. It was concluded that the huge variations encountered in total protein levels preclude their use in the diagnosis of maternal transfer of Ig through the colostrum and confirms that eletrophoresis and ZST are safe and accurate methods for this type of diagnosis. The ZST test is the method of choice for the diagnosis of maternal transfer of Ig through the colostrum, because it is simples, direct, fast, efficient and enables the diagnosis at Stud as soon as six hours after colostrum intake.

INDEX TERMS: Foal, immunity, equine.

SINOPSE.- O soro sangüíneo e o colostro de 17 éguas da raça PSC, no momento do parto, foram examinados pelos métodos do biureto, eletroforese e turvação pelo sulfato de zinco, para verificação dos níveis de proteína sérica. Amostras de soro dos seus potros, coletadas zero, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a ingestão do colostro, foram submetidas aos mesmos testes com o objetivo de se estabelecer um meio diagnóstico para imunodeficiência. Verificou-se, nos potros, um aumento significativo nos níveis séricos de proteína total ( $P < 0,0005$ ), gamaglobulina ( $P < 0,0001$ ) e turvação pelo sulfato de zinco ( $P < 0,0001$ ) desde a ingestão do colostro até 96 horas após. Tanto pela eletroforese como pela turvação pelo sulfato de zinco pôde-se detectar, seis horas após o potro mamar, níveis de Ig semelhantes ao do animal adulto. Conclui-se que as enor-

mes variações encontradas na proteína total impedem o uso de seus valores para o diagnóstico de transferência de Ig colostrual e confirma-se que a eletroforese e a turvação pelo sulfato de zinco são métodos seguros para esse diagnóstico. Chegou-se à conclusão de que o método da turvação pelo sulfato de zinco, por ser simples, direto, rápido e eficiente, permite o diagnóstico a nível de Haras a partir de seis horas após a ingestão do colostro.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Potro, imunidade, equíno.

## INTRODUÇÃO

O equíno apresenta um quadro de hipo ou agamaglobulinemia, no momento do nascimento, devido à placentação epitélio-corial, característica da espécie, que impede a transferência de imunoproteínas. Por este motivo, o potro, como em outras espécies, depende da ingestão de colostro para obter um nível de imunidade compatível com a sobrevivência.

A absorção das proteínas imunitárias do colostro pelo potro recém-nascido se processa de forma passiva através das células epiteliais especializadas do intestino delgado. O fechamento intestinal parece ocorrer pouco tempo após o nascimen-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 30 de agosto de 1983.

Parte da Tese apresentada pelo segundo autor como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul. Trabalho financiado pelo CNPq.

<sup>2</sup> Depto Clínica de Grandes Animais, UFSM, Santa Maria, RS 97100.

<sup>3</sup> Escola de Veterinária de Hannover, Bischofsholer Damm 15, Geburtshilfe, TiHo, 3000 Hannover 1, República Federal da Alemanha.

<sup>4</sup> Pinheiro Machado 493, Julio de Castilhos, Rio Grande do Sul 98130.

Quadro 1. Comparação entre os valores médios de proteína total, gamaglobulina e unidades de turvação observados no soro sanguíneo dos potros recém-nascidos e os do colostro e soro das éguas

Horas após primeira mamada	N	Proteína total <sup>(1)</sup>			Gamaglobulina <sup>(2)</sup>			Unidades de turvação <sup>(3)</sup>			
		g/100 ml	Erro P.M.	Variação	g/100 ml	Erro P.M.	Variação	N	X	Erro P.M.	Variação
0	10	3,90 ab*	0,228	3,15-5,75	0,002 a	0,002	0,000-0,029	4	7,14 a	2,934	1,40-14,39
1	9	3,86 a	0,365	2,71-6,55	0,032 a	0,023	0,000-0,216	9	8,32 a	2,190	2,00-21,57
3	12	3,60 a	0,228	2,03-5,17	0,126 a	0,042	0,005-0,423	10	18,80 a	3,370	4,23-38,59
6	12	4,67 bc	0,248	3,03-6,03	0,575 b	0,096	0,148-1,106	12	37,38 b	3,370	10,07-51,67
12	15	4,58 bc	0,251	3,22-6,74	0,855 c	0,127	0,143-1,846	12	45,43 bc	3,280	15,90-61,71
24	16	4,88 c	0,226	3,22-6,50	1,009 c	0,110	0,203-2,003	16	45,52 bc	3,540	13,99-66,49
48	15	5,18 c	0,294	3,77-8,72	1,032 c	0,136	0,237-2,554	14	47,49 c	3,510	18,44-66,72
72	12	5,29 c	0,337	3,55-7,80	1,054 c	0,137	0,427-2,293	11	45,71 c	3,580	18,44-63,06
96	11	4,69 c	0,182	3,88-5,71	0,827 bc	0,090	0,373-1,261	9	43,83 bc	4,790	21,05-65,75
Égua	14	6,07	0,252	3,66-7,36	0,985	0,078	0,600-1,590	14	53,07	4,390	23,26-74,90
Colostro	9	12,57	1,194	9,00-19,6	7,922	0,780	4,860-12,40	-	-	-	-

(1) Método do biureto.

(2) Método da eletroforese.

(3) Método da turvação pelo sulfato de zinco.

\* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente ao nível de 5%.

to devido à renovação dessas células por outras de aspecto mais maduro (Jeffcott 1979).

Estima-se em aproximadamente 5% a incidência de mortalidade perinatal na raça Puro-Sangue de Corrida. Este tipo de perda se deve, entre outras causas, a uma deficiência qualitativa e/ou quantitativa de imunoglobulinas.

Devido à falta de informação na literatura nacional a respeito do complexo "imunodeficiência", procurou-se determinar os níveis séricos de gamaglobulinas no colostro e no sangue de éguas no momento do parto, assim como de seus produtos desde o nascimento até as primeiras 96 horas de vida.

A partir deste experimento procurar-se-á estabelecer as bases para determinar o método mais simples e eficiente para o diagnóstico precoce da imunodeficiência no potro a nível de campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Como material utilizado no presente trabalho serviram 17 potros recém-nascidos, e suas respectivas mães, da raça Puro-Sangue de Corrida, dos Haras Henrique Waihrich e São Gabriel, dos municípios de Júlio de Castilhos e São Gabriel, RS.

Logo após o nascimento, antes da ingestão do colostro, colheu-se 7 ml de sangue da veia jugular do potro e da égua utilizando-se agulhas de coleta múltipla<sup>5</sup> com tubos a vácuo. Neste mesmo horário também foi obtida uma amostra de colostro. A seguir, foram retiradas oito amostras de sangue de cada potro em 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a primeira mamada. Após a retração do coágulo, todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm durante sete a dez minutos,

<sup>5</sup> Sistema Vacutainer-Becton, Dickinson Ind. Cirúrgicas S.A., Minas Gerais.

sendo o soro estocado a  $-18^{\circ}\text{C}$  juntamente com as amostras de colostro. Amostras que apresentaram hemólise não foram utilizadas no teste de turvação pelo sulfato de zinco.

Após descongelamento das amostras de soro e colostro à temperatura de  $24-27^{\circ}\text{C}$ , procedeu-se a dosagem das proteínas séricas e colostrais pelo método do biureto<sup>6</sup> com leitura em fotocolorímetro<sup>7</sup>. Para o fracionamento eletroforético utilizou-se fitas de acetato de celulose gelatinizadas<sup>8</sup> com solução-tampão de dietil barbiturato de sódio<sup>9</sup> a 8,4% com pH 8,6.

Os resultados da eletroforese foram obtidos em percentagem através da leitura em densitômetro<sup>10</sup>. A partir dos dados conseguidos na avaliação da proteína total em gramas/100 ml, calculou-se a proporção de cada fração protéica dos soros.

Para a avaliação da presença de imunoglobulinas utilizou-se também o teste da turvação pelo sulfato de zinco, segundo McEwan et al. (1970), sendo feita a leitura das amostras em espectrofotômetro<sup>11</sup>.

Neste teste o comprimento de onda utilizado foi de 450 nm, visto que o mesmo corresponde ao filtro de coloração verde-azulada indicado por McEwan et al. (1970), o qual coincide com o maior grau de absorção observado quando da leitura com a solução padrão de sulfato de bário através de toda região visível do espectrofotômetro.

O desenho experimental foi inteiramente casualizado de um experimento não balanceado.

As análises estatísticas incluíram a análise de variância, estudos de correlação e regressão (Steel & Torrie 1980). Diferenças significativas ao nível de 5% ensejaram estudos de comparação com grau de liberdade individual testados pelo teste F, ao mesmo nível de significância.

## RESULTADOS

No Quadro 1 estão descritos todos os valores médios de proteína total, gamaglobulina e unidades de turvação pelo sulfato de zinco, com seus respectivos erros padrões das médias e níveis máximos e mínimos, detectados nas amostras dos so-

<sup>6</sup> Proteínas Totais (Biureto), Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Goiás.

<sup>7</sup> Fotocolorímetro Bausch & Lomb-Spectronic 20.

<sup>8</sup> Cellogel, Empresa Medimex Importação e Comércio Ltda, Rio de Janeiro.

<sup>9</sup> Veronal sódico, Laboratório Queel, São Paulo.

<sup>10</sup> Densitômetro (Cosmo Densitometer), Super Click Model D-101.

<sup>11</sup> Espectrofotômetro Carl Zeiss.

## DIAGNÓSTICO DA IMUNIDADE PASSIVA NO POTRO RECÊM-NASCIDO

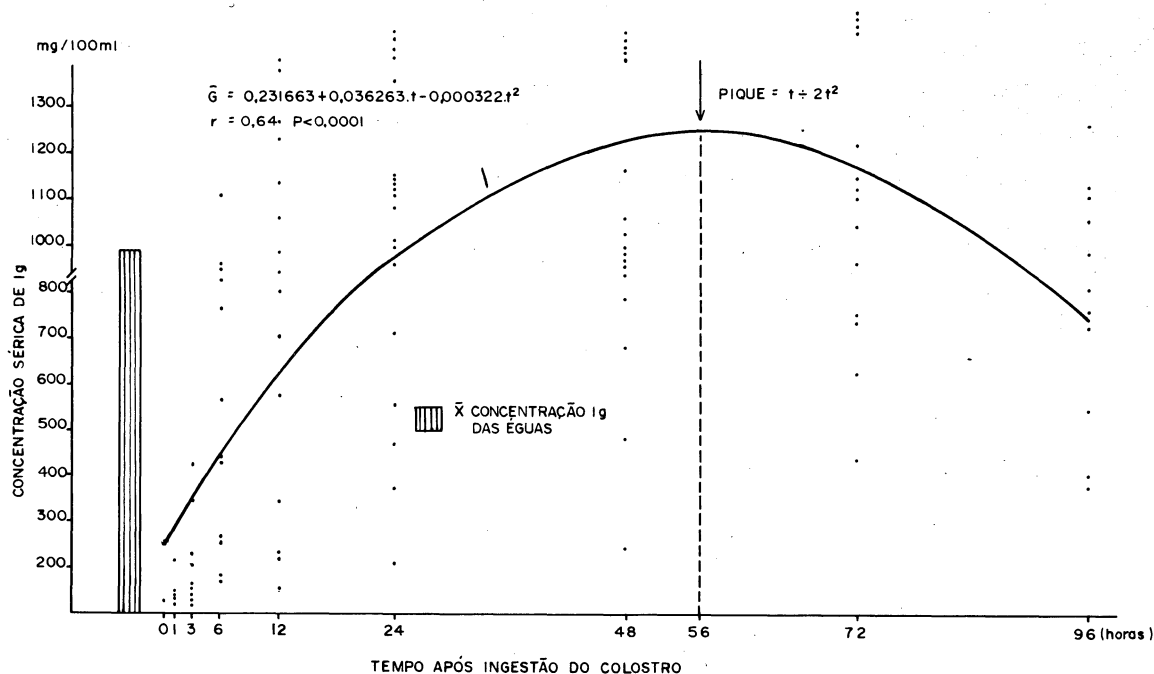


Fig. 1. Curva de regressão entre os níveis de concentração de gamaglobulina no soro dos potros e o tempo decorrido desde a ingestão do colostro até as 96 horas, comparada à média das concentrações de Ig das éguas.

ros dos potros em cada intervalo de tempo, no colostro e no soro das éguas. Apenas nas amostras de colostro não foi realizado o teste de turvação pelo sulfato de zinco devido à dificuldade de separação da parte sólida.

Observa-se, no Quadro 1, que tanto os aumentos nos níveis de proteína total, como de gamaglobulina e turvação pelo sulfato de zinco, são estatisticamente significantes ( $P < 0,0001$ ) a partir das seis horas após a primeira mamada. Nas 6-12 horas já se observam valores de gamaglobulina e turvação pelo sulfato de zinco semelhantes aos encontrados no soro do animal adulto.

De acordo com o Quadro 1 encontram-se, comumente, antes da primeira mamada, valores de proteína total superiores a aqueles verificados 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após. Isto é, há uma enorme variação nos valores de proteína total em cada tempo, apesar de que os valores médios aumentam significativamente ( $P < 0,0005$ ).

Observa-se na Figura 1 a curva de regressão para as variações dos teores de gamaglobulina no decorrer do tempo a partir de imediatamente antes da ingestão colostrálica até 96 horas após, comparando-se esses valores com o nível médio de imunoglobulina das éguas. Esta curva indica que os aumentos no decorrer do tempo, principalmente a partir das seis horas da primeira mamada, são altamente significativos ( $\bar{G} = 0,23 + 0,03.t - 0,0003.t^2$ ;  $r = 0,64$ ;  $P < 0,0001$ ), prevendo-se um pique nos níveis séricos de gamaglobulina em torno das 56 horas após a ingestão do colostro. Antes da primeira mamada e uma hora após nenhum ponto no gráfico está localizado acima da curva, ocorrendo apenas um caso nas 3 horas. Depois de seis horas são inúmeros os valores superiores, o que indica grande absorção de imunoglobulinas. Nota-se, ainda, que, em torno de 6-24

horas depois do potro mamar, encontram-se níveis de imunoglobulina sérica semelhantes a aqueles do adulto.

Baseando-se nos resultados da turvação pelo sulfato de zinco, pode ser montada uma curva para as variações dos valores de absorvância (em unidades de TSZ) do soro dos potros no decorrer do tempo, comparando-se esses dados ao nível médio de turvação do animal adulto (Fig. 2). Esta curva confirmou que as taxas de aumento na turvação, principalmente a partir de seis horas após a primeira mamada, são extremamente significativas ( $\bar{Y} = 20,83 + 1,13.t - 0,0099.t^2$ ;  $r = 0,61$ ;  $P < 0,0001$ ), prevendo-se um pique na turvação pelo sulfato de zinco em torno das 57 horas e 30 minutos. Os indicadores de TSZ não sofreram, como foi o caso da gamaglobulina, uma variação tão grande como aquela da proteína total. Observa-se também para a TSZ que, já de 6-24 horas depois de mamar, alguns potros apresentam turvações semelhantes às das éguas (Fig. 2).

Comparando-se os resultados da eletroforese com a turvação pelo sulfato de zinco ( $\bar{G} = 0,09 + 0,022.Y$ ;  $r = 0,75$ ;  $P < 0,0001$ ) verificou-se uma correlação altamente significativa entre os valores obtidos pelos dois métodos (Fig. 3). Observando-se a reta determinada pode-se estimar que, sob uma turvação de 25 unidades de TSZ, encontra-se uma concentração de imunoglobulina sérica de aproximadamente 450 mg por 100 ml de soro.

## DISCUSSÃO

Deficiências ou falhas na transferência passiva de imunoglobulinas em potrinhos podem ser detectadas por avaliação da IgG sérica (McGuire et al. 1975 e 1977), o que foi corroborado nas determinações realizadas no decorrer deste trabalho.

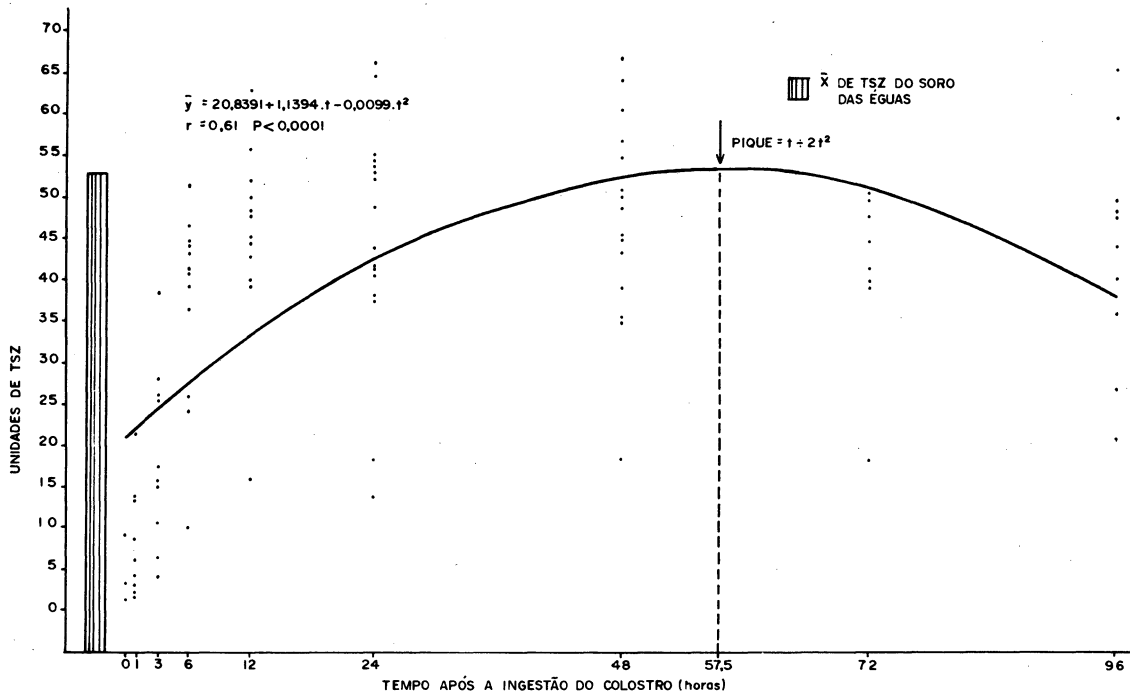


Fig. 2. Curva de regressão entre as unidades de TSZ no soro dos potros e o tempo decorrido desde a ingestão do colostro até as 96 horas, comparada à média das unidades de TSZ do soro das éguas.

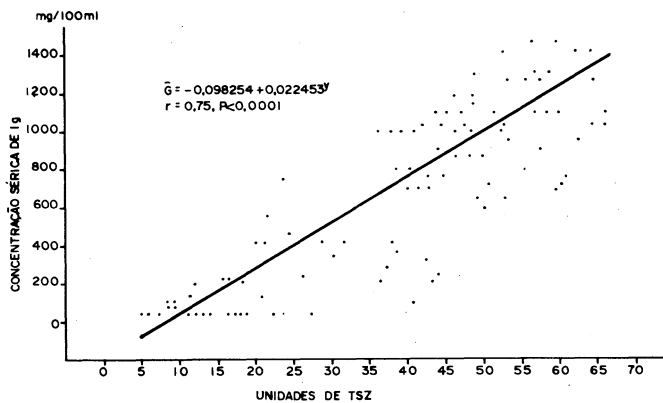


Fig. 3. Relação entre os níveis de concentração de gamaglobulina e as unidades de TSZ no soro dos potros desde a ingestão do colostro até as 96 horas.

Os potrinhos, no momento do nascimento, são hipo ou agamaglobulinêmicos, verificando-se ausência ou, no máximo, valores muito baixos de imunoglobulinas (Quadro 1), o que está de acordo com os resultados obtidos por Rejnek et al. (1973).

Através da dosagem da proteína total pelo método do biureto (Quadro 1) no soro, verificou-se valores maiores de proteína total antes do que depois da ingestão do colostro em alguns potros, porém a média de proteína total em cada tempo demonstra um aumento progressivo. Isto significa que o aumento dos níveis de proteína é um indicativo de que houve transferência de imunoglobulina colostrual nesses potros.

O valor da proteína total serve para estimar a imunoglobulina no soro de potros e bezerros (Rumbaugh et al. 1978, McBeath et al. 1971, Reid & Martinez 1975); no entanto, é

apenas um meio indireto de estimar o nível sérico de imunoglobulina, onde supõe-se que houve falha na transferência dos anticorpos quando a proteína total apresenta-se baixa após o recém-nascido ter mamado (Jeffcott 1972). Na verdade, as concentrações de proteína sérica nos potros, antes de mamar, variaram de 3,15 a 5,75 g/100 ml (Quadro 1) e observou-se que alguns potros, mesmo antes de mamar, apresentavam concentrações de proteína total maiores do que potros que já haviam mamado o colostro. Mesmo levando-se em consideração que os potros que mamam apresentam valores maiores de proteína, essas variações nas concentrações entre os pontos privados e os alimentados com o colostro tornam a determinação da proteína total pelo método do biureto de pouco valor para o diagnóstico da imunodeficiência.

Verificou-se que, a partir de uma hora após os potros terem ingerido o colostro, aumentava rapidamente a concentração da gamaglobulina sérica. Os valores encontrados entre as 6 e 24 horas indicam uma intensa absorção de imunoglobulinas o que corrobora os resultados de Jeffcott (1974b), que verificou uma absorção máxima de imunoglobulinas entre as 12 e 18 horas de vida pós-parto.

A determinação de valores até 200 mg/100 ml de imunoglobulina no soro de potros que já mamaram o colostro indica uma falha na transferência passiva de imunoglobulinas (Rumbaugh et al. 1978 e 1979). Níveis de imunoglobulina sérica entre 200 e 400 mg por 100 ml sugeririam uma falha parcial e, observando-se níveis maiores que 400 mg/100 ml, haveria indicação de transferência de imunoglobulina colostrual (McGuire et al. 1977). Potros saudáveis, às 18-24 horas de vida, teriam uma concentração sérica de imunoglobulina em torno de 800 mg/100 ml (Jeffcott 1974b, Morgan 1972, Morgan & Mock 1975).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho encontra-se na maioria dos potros sadios, após seis horas da ingestão do colostro, níveis Ig superiores a 400 mg/100 ml de soro (Quadro 1).

A determinação dos valores de imunoglobulina por eletroforese do soro é um método eficiente, que não requer testes ou curva padrão; por isso os resultados podem ser avaliados direta e individualmente. No entanto, a eletroforese é um método dispendioso e a grande maioria dos veterinários não possui o equipamento necessário nos seus laboratórios, tendo que se valer de outras fontes para obter os resultados; isso pode retardar de forma fatal a terapia em casos de imunodeficiência.

O teste da turvação pelo sulfato de zinco é um método rápido e eficiente para a determinação de falhas na transferência de imunoglobulina colostrálica. Os resultados da TSZ são mais palpáveis quando comparados com uma curva padrão como foi apresentado neste trabalho (Fig. 3). Nas medições das amostras testadas por este método utilizou-se o comprimento de onda de 450 nm porque produz leituras de turvação que estão abaixo da unidade em altas concentrações de imunoglobulina e permite uma boa distribuição dos valores de Ig entre 200 e 1500 mg/100 ml. Usando-se um filtro de 450 nm, uma densidade óptica (DO) de 0,300 é indicativa de falha na transferência passiva de imunoglobulinas. Numa DO de 0,600 o precipitado de sulfato de zinco torna-se visível no tubo e indicaria ter ocorrido a transferência de Ig.

Na falta de um espectrofotômetro, quando o soro de um potro recém-nascido deve ser examinado, o que deve ocorrer na maioria das situações na prática, a simples constatação de opacidade ou turvação no tubo, semelhante àquela da solução de sulfato de bário, é indicação suficiente de que o potro ingeriu e absorveu Ig colostrálica, estando a concentração de gamaglobulina, provavelmente, acima de 400 mg/100ml de soro (Fig. 3).

Entre os três métodos testados, indubitavelmente o da turvação pelo sulfato de zinco é o que melhor preenche esses requisitos, pois, além de não requerer grande experiência laboratorial do veterinário, oferece um resultado rápido e pode ser interpretado, inclusive, à simples inspeção.

## REFERÊNCIAS

- Jeffcott L.B. 1972. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. *Biol. Rev.* 47:439-464.
- Jeffcott L.B. 1974. Studies on passive immunity in the foal. I. Y-globulin and antibody variations associated with the maternal transfer of immunity and onset of active immunity. *J. Comp. Pathol.* 84:93-101.
- Jeffcott L.B. 1979. Aspectos práticos a respeito da imunidade passiva do potro recém-nascido, p. 81-91. *Ciclo Internacional de clínica Veterinária Equina*. Vol. 2. Ed. Gráfica Cairú, São Paulo.
- McBeath D.G., Penhale W.J. & Logan E.F. 1971. An examination of the influence of husbandry on the plasma immunoglobulin level of the newborn calf a rapid refractometer test for assessing immunoglobulin content. *Vet. Rec.* 88: 266-270.
- McEwan A.D., Fisher E.W., Selman I.E. & Penhale W.J. 1970. A turbidity test for estimation of immune globulin. Levels in neonatal calf serum. *Clin. Chim. Acta* 27: 155-163.
- McGuire T.C., Poppie M.J. & Banks K.L. 1975. Hypogammaglobulinemia predisposing to infection in foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 166: 71-75.
- McGuire T.C., Crawford T.B., Hallowell A.L. & Macomber L.E. 1977. Failure of colostrum immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170: 1302-1304.
- Morgan D.O. 1972. Serum proteins of neonatal foals. *Proc. Int. Conf. Equine Infectious Diseases*. Vol. 3. Paris, p. 410-418.
- Morgan D.O. & Mock R.E. 1975. Serum proteins of the neonatal foal, *Proc. Int. Symposium on Equine Hematology*. Vol. 1. Am. Assoc. Equine Pract., Michigan, p. 183-188.
- Reid J.F.S. & Martinez A.A. 1975. A modified refractometer method as a practical aid to the epidemiological investigation of disease in the neonatal ruminant. *Vet. Rec.* 96: 177-179.
- Rejnek J., Prokesova L., Serzl J. & Matousek V. 1973. The presence of IgG and IgM in full term horse umbilical cord sera. A quantitative study. *Immunochem.* 10: 397-399.
- Rumbaugh G.E., Ardans A.A., Ginno B.A.D. & Trommershausen-Smith A. 1978. Measurement of neonatal equine immunoglobulins for Assessment of colostrum immunoglobulin transfer: Comparison of single radial immunodiffusion with the Zinc Sulphate Turbidity Test, Serum Electrophoresis, Refractometer for Total Serum Protein, and the Sodium Sulfite Precipitation Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 321-325.
- Rumbaugh G.E., Ardans A.A., Ginno B.A.D. & Trommershausen-Smith A. 1979. Identification and treatment of colostrum-deficient foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174: 321-325.
- Steel R.G.D. & Torrie J.H. 1980. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach, 2nd ed. McGraw-Hill, New York.