

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE DA
TURVAÇÃO PELO SULFATO DE ZINCO EM
POTROS NEONATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Endrigo Pompermayer

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE DA TURVAÇÃO
PELO SULFATO DE ZINCO EM POTROS NEONATOS**

por

Endrigo Pompermayer

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE DA TURVAÇÃO
PELO SULFATO DE ZINCO EM POTROS NEONATOS**

elaborada por
Endrigo Pompermayer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Mara Iolanda Batistella Rubin, Dr.
(Presidente/Orientador)

Rodrigo Costa Mattos, Dr. (UFRGS)

Karin Erica Brass, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 21 de Fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, ela é maravilhosa;

Aos meus pais, Cecilia e Celito, que nunca mediram esforços para a realização dos nossos sonhos e que são para mim um exemplo a ser seguido. Ao meu irmão Eduardo, por todo o carinho, amizade e companheirismo dedicados, mesmo a distância. Muito obrigado pelo amor e apoio incondicional;

À minha esposa Ana Paula, de importância impar na minha vida, obrigado pelo amor, carinho, compreensão sem medidas, por estar sempre ao meu lado, incentivando-me;

À minha orientadora Mara I. B. Rubin, que me adotou em um momento difícil e não mediu esforços para a realização da pesquisa, tornando-se uma grande amiga e companheira. Ao Dr. Carlos A. M. Silva, pelos ensinamentos e valiosas contribuições ao trabalho com o TSZ, do qual é o idealizador;

Ao meu co-orientador e grande mestre Dr. Flávio D. De La Corte, exemplo ético e profissional. Muito obrigado pelos ensinamentos, oportunidades e pela confiança durante o período em que fui acolhido como estagiário e posteriormente como pós-graduando na Clínica de Equinos. À minha co-orientadora e colega de clínica Dra. Karin E. Brass, pelos ensinamentos transmitidos nesses anos de convivência;

Ao médico veterinário Paulo N. L. Bergamo, um excelente parceiro das pesquisas da UFSM e que proporcionou de forma singular apoio irrestrito ao desenvolvimento deste estudo por visualizar sua importância. Muito obrigado amigo, e também a sua família, pela acolhida em sua residência, pelo aprendizado e a convivência no haras. Aos médicos veterinários, Alex B. G. Menezes, Aline R. Vivian, Carlos H. B. Borges, Emílio V. C. de Borba, Friedrich Frey Jr., Gabriele B. da Silva, Luisa L. Silveira, Marcio C. Stanicki, Miguel Gallio, Raul H. G. da Rocha, Roberta C. F. Pereira, Roberto V. da Silveira, Sabine Kasinger, Vanessa M. Brucker e Ulisses L. Carneiro pela colaboração na coleta de material, dados e dedicação em auxiliar-me;

Aos colegas Diego De Gasperi, Diego R. P. da Silva, Gabriele B. da Silva, Marcos S. Azevedo, Roberta C. F. Pereira, Ricardo Pozzobon e Thiago R. R. Luz pelo companheirismo durante o trabalho na clínica e aos estagiários da Clínica de Equinos/Embryolab pela colaboração;

À Universidade Federal de Santa Maria, a qual me orgulha muito por ter realizado a graduação e o curso de Mestrado. Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram e me incentivaram.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE DA TURVAÇÃO PELO SULFATO DE ZINCO EM POTROS NEONATOS

Autor: Endrigo Pompermayer

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

Co-orientador: Flávio Desessards De La Côte

Co-orientadora: Karin Erica Brass

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de Fevereiro de 2011.

A imunidade passiva adquirida pelo potro neonato através da ingestão do colostro é essencial para a prevenção das infecções neonatais. O objetivo deste trabalho foi determinar a sensibilidade e a especificidade do teste da turvação pelo sulfato de zinco (TSZ) 12 horas após a primeira ingestão de colostro para detecção de imunoglobulinas G (IgG) para indicar ou não a deficiência de transferência da imunidade passiva. Não houve diferença nos resultados do teste TSZ com amostras séricas de potros PSC coletadas 12 (n=110) ou 18h (n=38) após a primeira ingestão do colostro, confirmando que o teste pode ser conduzido 12h após a ingestão de colostro. Quando comparado com a imunodifusão radial simples, o teste TSZ apresentou sensibilidade de 76,50%, 95,65% e de 94,68% e especificidade 93,75%, 93,94% e de 75,92%, para padrões de 400, 600 e 800mg dL⁻¹ de IgG, respectivamente. Assim, o TSZ é um valioso teste para o diagnóstico no campo, desde que sejam seguidas estritamente as indicações do fabricante, especialmente quanto à temperatura. O teste pode e deve ser realizado 12 horas após a primeira mamada, pois apresenta bom índice de precisão.

Palavras-chaves: equino, IgG, imunoglobulina, colostro, TSZ, imunidade passiva.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF THE ZINC SULFATE TURBIDITY TEST IN NEWBORN FOALS

Autor: Endrigo Pompermayer

Adviser: Mara Iolanda Batistella Rubin

Co-Adviser: Flávio Desessards De La Côte

Co-Adviser: Karin Erica Brass

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de Fevereiro de 2011.

Passive immunity acquired by the newborn foal through the colostrum is essential to prevent perinatal infections. The aim of this study was to establish the sensitivity and specificity of the zinc sulfate turbidity test (ZST) 12 hours after first suckling for the detection of immunoglobulins (IgG) to indicate or not the failure of passive immunity transfer. There was no difference in the ZST results obtained from blood collected at 12 (n=110) and 18 (n=38) hours, confirming that the test may be performed as early as 12 hours after the first colostrum intake. When compared to the single radial immunodiffusion test, the ZST test showed 76.50%, 95.65% and 94.68% sensitivity and 93.75%, 93.94% and 75.92% specificity, respectively, for a standard of 400, 600 and 800 mg dL⁻¹ of immunoglobulins (IgG). The results of the ZST test, i.e. according to label instructions, performed 12 hours after the first suckling at 37°C is a reliable diagnostic tool for detecting IgG levels in newborn foals.

Key words: equine, IgG, immunoglobulin, colostrum, ZST, passive immunity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Média dos níveis de IgG sérica detectados por Imunodifusão Radial Simples às 12 e 18 horas após a primeira ingestão de colostro em 38 potros recém-nascidos, pertencentes a dois criatórios da raça Puro Sangue de Corrida ($P < 0,05$)..... 31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Efeito do tempo e temperatura na turvação da reação entre o sulfato de zinco e o soro.....17

CAPÍTULO 1

TABELA 1: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste da Turvação pelo Sulfato de Zinco determinado por Imunodifusão Radial Simples, comparando-se três pontos de corte de imunoglobulinas séricas de potros recém-nascidos de oito criatórios da raça Puro Sangue de Corrida. Teste conduzido em laboratório com amostras séricas congeladas.....32

TABELA 2: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste da Turvação pelo Sulfato de Zinco determinado por Imunodifusão Radial Simples, comparando-se três pontos de corte de imunoglobulinas séricas de potros recém-nascidos de oito criatórios da raça Puro Sangue de Corrida. Teste conduzido nos haras.....33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Transmissão da imunidade para o recém-nascido	11
2.2. Mecanismo e duração da absorção de proteínas colostrais.....	12
2.3. Encerramento da absorção das imunoglobulinas colostrais.....	14
2.4. Fatores que influenciam negativamente no mecanismo de transferência de imunidade passiva.....	14
2.5. Métodos de determinação do estado imunitário	15
2.6. Fatores que influenciam na reação da turvação pelo sulfato de zinco.....	17
3. CAPÍTULO 1.....	18
4. CONCLUSÕES	34
5. REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

A criação de eqüinos está em crescente expansão, e o cavalo, muito mais do que para uso no trabalho ou como atleta, está assumindo um posto de animal de estimação. Mundialmente são investidos recursos consideráveis na criação e treinamento de cavalos de corrida, mesmo com as frequentes decepções associadas à atividade (WILSHER et al., 2006). Consideráveis perdas acontecem ainda no primeiro dia de vida (MELLOR & STAFFORD, 2004), ou são decorrentes de problemas nas primeiras horas de vida do potro (RUBIN, 1982).

A ausência da passagem de imunoglobulinas para a circulação fetal do equino está relacionada com placenta materna do tipo epitélio-corial (REJNEK et al., 1973). Assim, a proteção transitória conferida ao potro recém-nascido é obtida através da absorção de anticorpos colostrais por células especializadas do intestino delgado (BRUNER et al., 1948; TIZARD, 2002). A absorção máxima de imunoglobulinas ocorre três a seis horas após a primeira mamada (CLÉMENT et al., 2002) e de acordo com Jeffcott (1974) cai linearmente a 1% na vigésima hora de vida do potro.

A concentração de anticorpos encontrada no colostro durante o seu período de síntese é cinco vezes mais elevada do que a do soro sanguíneo, o que reforça a preferência pela aplicação de colostro via oral como fonte suplementar de imunoglobulinas em potros neonatos imunodeficientes (LeBLANC et al., 1990; CHAVATTE et al., 1998; ERHARD et al., 2001). A duração da secreção do colostro na égua é curta e seus níveis de imunoglobulina caem rapidamente após as primeiras mamadas do potro; 12 a 15 horas pós-parto sua concentração se reduz para 10 a 20% dos níveis originais (JEFFCOTT, 1979).

O diagnóstico da falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) é, rotineiramente, realizado 18 horas após o parto (CRISMAN & SCARRATT, 2008), muito próximo do início do fechamento da barreira intestinal nos potros, enquanto que 12 horas após o parto já se pode diagnosticar a absorção da imunidade colostrais (AXON & PALMER, 2008). Na década de 80, Silva et al. (1984) já haviam descrito que quando detectada precocemente, a FTIP pode ser corrigida com administração de colostro por via oral.

Os níveis séricos de imunoglobulinas acima de 800mg dL⁻¹ são considerados fisiológicos para potros neonatos; sugere-se como falha parcial na transferência de imunidade níveis de IgG entre 400-800mg dL⁻¹ considerando como falha crítica quando os níveis encontram-se abaixo de 400mg dL⁻¹ (PARISH, 1996; CRISMAN & SCARRATT, 2008). A avaliação direta ou indireta das imunoglobulinas séricas é a condição para verificar se ocorreu

uma adequada transferência de imunidade. Esta pode ser feita de várias formas: turvação pelo sulfato de zinco, imunodifusão radial simples, técnica imunoenzimática, eletroforese, determinação da proteína total, imunoturbidimetria e infravermelho.

O método da Turvação pelo Sulfato de Zinco (TSZ) é o método indireto, subjetivo, de eleição para essa avaliação. Envolve a precipitação de proteínas imunológicas quando o soro é adicionado à solução de sulfato de zinco (KUNKEL, 1947). A turvação formada é comparada à solução padrão de sulfato de bário e ácido sulfúrico (RUMBAUGH et al., 1978 e 1979). O teste é de fácil execução a campo, rápido e de baixo custo (SILVA et al., 1984).

A imunodifusão radial simples (IDRS) permite a determinação direta, objetiva e individual das imunoglobulinas IgG, IgG (T), IgM, IgA e AI (imunoglobulinas agregadas). No entanto este método requer mais tempo de trabalho laboratorial (18 a 24 horas) e tem custo elevado, se comparado a outros testes, o que limita o seu uso no campo e seu valor diagnóstico para contornar a imunodeficiência, não permitindo ou dificultando o uso da aplicação de colostro por via oral (McGUIRE & CRAWFORD, 1972). Apesar disso, a IDRS é considerada o teste padrão de referência para a determinação de imunoglobulinas no soro do neonato (BAIRD et al., 1987; YOUNG & LUNN, 2000).

Este estudo teve por objetivo avaliar a sensibilidade e especificidade do teste de turvação pelo sulfato de zinco como método diagnóstico precoce da transferência de imunidade passiva em potros recém-nascidos; verificar a viabilidade de seu uso 12h após a primeira mamada e como a manipulação das amostras sanguíneas e a aplicação do teste no campo podem alterar a turvação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Transmissão da imunidade para o recém-nascido

A égua apresenta placenta do tipo epitélio-corial difusa, que não permite a transferência transplacentária de quantidades significativas de macromoléculas para a circulação fetal (CHUCRI, 2010). Sendo assim, a proteção transitória conferida ao potro recém-nascido é obtida através da absorção de anticorpos colostrais por células especializadas do intestino delgado (TIZARD, 2002), que confere a imunidade passiva adquirida. A secreção de colostro é rápida e os níveis de imunoglobulinas diminuem drasticamente em 24 horas (JEFFCOTT, 1974a; BLOOD & RADOSTITIS, 1991).

Em todas as espécies nas quais os anticorpos maternos são transferidos após o nascimento, através do colostro, esse processo ocorre através do epitélio do intestino delgado do recém-nascido (SIMPSON-MORGAN & SMEATON, 1972; TIZARD, 2002).

Os anticorpos produzidos pela égua são transmitidos, para a circulação do recém-nascido, e alcançam concentrações em seu soro que equivalem aos de um animal adulto (BRUNER et al., 1948; JEFFCOTT, 1974a). Os potros privados da ingestão do colostro nas primeiras horas de vida apresentam menor absorção de imunoglobulinas (JEFFCOTT, 1971; RAIDAL et al., 2000) e, conseqüentemente, são mais susceptíveis a infecções que aqueles que receberam altas quantidades (ROSSDALE, 1972; KAUFMAN, 1973; POPPIE & McGUIRE, 1976; LESTER, 2005).

A aquisição da imunidade passiva pelo potro está diretamente relacionada a fatores maternos como saúde geral, estado nutricional, produção láctea, instinto maternal (JEFFCOTT, 1974a), bem como a fatores individuais como debilidade ou deformidade que retarde o ato de se levantar determinando um período de tempo superior a uma ou duas horas para a primeira mamada (JEFFCOTT, 1972b) e também ao processo de “cessação da absorção intestinal” de macromoléculas (RAIDAL et al., 2000).

Sabe-se que ao nascimento, os animais podem ser agamaglobulinêmicos ou hipogamaglobulinêmicos (EARLE, 1935; BRUNER et al., 1948; ROUSE, 1971; SIMPSON-MORGAN & SMEATON, 1972; RUBIN, 1982). A concentração de anticorpos encontrada no colostro durante o período da síntese é bem mais elevada do que a do soro sanguíneo (BRUNER et al., 1948). A égua tem um declínio nos níveis séricos de gamaglobulina como resultado de transferência seletiva da referida globulina para o colostro (JEFFCOTT, 1971).

A égua possui a capacidade de selecionar imunoglobulinas do soro e de concentrá-las no colostro semanas antes do parto (JEFFCOTT, 1972a e 1974a). No colostro predominam imunoglobulinas IgG e IgG (T) e em menores proporções IgM e IgA (JEFFCOTT, 1972a e 1974a; McDOUGALL, 1975; TIZARD, 2002). A duração da secreção do colostro na égua é de pouco tempo e seus níveis caem rapidamente após as primeiras mamadas, sendo que 12 a 15 horas após a primeira mamada sua concentração é de somente 10 a 20% dos níveis originais (JEFFCOTT, 1979; CHAVATTE et al., 1998).

Ao examinar amostras de colostro de éguas gestantes, Jeffcott (1974b) pôde determinar a concentração média de proteínas colostrais antes do potro mamar como sendo de 25 g dL^{-1} , chegando a $7,0 \text{ g dL}^{-1}$ sete horas após, e, ainda assim, com níveis bem superiores àqueles encontrados no soro sanguíneo da mãe. Em um grupo de potros saudáveis e que mamaram adequadamente foi possível identificar o valor médio de gamaglobulina de 820 mg/100 mL , correspondente ao pique de imunoproteínas que ocorreu das 12 às 18h após o nascimento. Erhard (2001) observou uma diminuição acentuada na concentração de IgG no colostro a partir de nove horas pós-parto.

Assim, o adequado nível de imunoglobulinas no sangue do potro está na dependência do alto nível de concentração no colostro, de suficiente quantidade de colostro mamado e de títulos efetivos de anticorpos absorvidos (POPPIE & McGUIRE, 1976; RUMBAUGH et al., 1978). A estimativa dos níveis séricos de imunoglobulina colostril associada à criteriosa observação clínica, é importante para identificar deficiências de absorção e realizar adequada suplementação terapêutica (JEFFCOTT, 1974b; McGUIRE et al., 1977).

2.2. Mecanismo e duração da absorção de proteínas colostrais

No potro recém-nascido, a absorção das imunoglobulinas do colostro pelas células especializadas do intestino delgado ocorre através do processo de englobamento de macromoléculas chamado “pinocitose”. As macromoléculas são metabolizadas em partículas pequenas e passam aos espaços intercelulares. Destes espaços são transferidas aos condutos quilíferos locais, e após, à corrente sanguínea (RAIDAL et al., 2000; RIDDLE, 2003). O processo é lento e a absorção máxima ocorre aproximadamente seis horas após a ingestão do colostro.

Bruner et al. (1950) estabeleceram a duração da permeabilidade intestinal em 24-36 horas. Jeffcott (1971) observou que o referido período diminuía desde o nascimento até às 24

horas, tempo que coincide com o término da proteinúria transitória característica, relatada há mais de quatro décadas no bezerro por Pierce (1960) e, posteriormente, no potro por Jeffcott & Jeffcott (1974).

Jeffcott (1974c) relata que a absorção das macromoléculas pelas células intestinais não é seletiva, tendo confirmado esta afirmação através do uso de uma substância radioativa, o Iodo 125 (I-PVP K-60) de peso molecular 160.000, capaz de ser absorvida de maneira efetiva como a gamaglobulina do colostro. A absorção máxima do PVP ocorreu três horas após o nascimento (22%), caindo linearmente a 1% nas 20 horas de vida. Raidal e colaboradores (2000) verificaram a capacidade de absorção de 57% do que é ingerido e que o encerramento da mesma não foi mediado, mas definido como capacidade finita.

Os estudos conduzidos com potros por McGuire & Crawford (1973) relatam a existência de concentrações séricas de IgM antes da ingestão de colostro, e um de quatro produtos apresentou IgG. Isso sugere a capacidade do feto equino em sintetizar algumas imunoproteínas antes do nascimento. Entre o 16° e o 24° dia pós-natal iniciou a produção de IgG, IgG (T) e IgA em um dos animais que absorveu pequenas concentrações de cada classe de imunoglobulina. Isto evidencia que o animal jovem é altamente dependente da imunidade passiva até a terceira e quarta semana de vida, apresentando logo após competência imunológica. Posteriormente, Jeffcott (1979) constatou que a duração da imunidade passiva do potro não se estende por mais de seis meses e por algum tempo antes disto os níveis de anticorpos detectados são de valor protetor duvidoso. A habilidade do potro em sintetizar suas próprias imunoglobulinas foi verificada no início da segunda semana de idade, o que indica que há produção entre 7-14 dias, e que, portanto o potro é imunocompetente muito cedo após o nascimento.

Equinos adultos saudáveis possuem níveis séricos de imunoglobulinas entre: 500 a 2.000mg dL⁻¹ de IgG, 80 a 200mg dL⁻¹ de IgM, 60 a 350mg dL⁻¹ de IgA e 100 a 1.500mg dL⁻¹ de IgG (T) (TIZARD, 2002). Para potros, considera-se fisiológico níveis séricos de imunoglobulinas acima de 800mg dL⁻¹, porém quando há falha na transferência de imunidade, considera-se falha parcial níveis entre 200-400mg dL⁻¹ e falha total abaixo de 200mg dL⁻¹ (PARISH, 1996; CRISMAN & SCARRATT, 2008).

2.3. Encerramento da absorção das imunoglobulinas colostrais

Acredita-se que múltiplos fatores estão envolvidos no processo de encerramento da absorção das imunoglobulinas e que os hormônios da córtex adrenal desempenham um importante papel neste mecanismo. Halliday (1959) e Jeffcott (1972a) observaram altos níveis de corticóides adrenais presentes no momento do parto sugerindo sua influência nas células intestinais através de alterações na permeabilidade das mesmas.

Raidal e colaboradores (2000) verificaram grande capacidade de absorção de imunoglobulinas por células do intestino delgado, porém ela é transitória e não mediada. Esta diminui drasticamente 12 horas após o parto (RAIDAL et al., 2000; HOFSAESS, 2001).

2.4. Fatores que influenciam negativamente no mecanismo de transferência de imunidade passiva

Lactação prematura

O colostro é produzido de uma só vez, a cada gestação. O gotejamento prematuro contínuo e persistente por alguns dias pode reduzir drasticamente a quantidade de proteínas imunitárias disponíveis. Na égua, esse fator é o mais comum e importante, pois limita a transferência de imunidade passiva ao recém-nascido (JEFFCOTT, 1974a; McGUIRE et al., 1975).

A lactação prematura pode ocorrer quando há placentite, parto gemelar ou separação placentária. Entretanto em algumas éguas sem alterações aparentes na placenta, o gotejamento pode iniciar alguns dias ou horas antes do parto (MACPHERSON, 2006; MACPHERSON & BAILEY, 2008).

Deficiente produção de colostro

Esta condição ocorre em algumas éguas que estão gestando pela primeira vez. Pressupõe-se que há simplesmente uma deficiência no mecanismo seletivo da glândula mamária para concentrar imunoproteínas do sangue antes do parto, ou éguas mais velhas com dificuldade de armazenar o colostro na glandula mamária (JEFFCOTT, 1974a).

Potros com acesso retardado ao colostro

Potros nascidos débeis ou com algum defeito físico inaparente levam mais tempo para levantar-se que o período fisiológico de uma ou duas horas (Rossdale apud JEFFCOTT, 1974-a). Os produtos que demoram a apresentar o reflexo de sucção geralmente se recuperam, porém isso pode durar mais do que a duração da permeabilidade intestinal (PIERCE, 2003).

Prematuridade

Payne & Marsh (1962) observaram que a maturidade parece não afetar a habilidade intestinal do recém-nascido em absorver grandes moléculas. A absorção intestinal para macro-moléculas é dependente de células especializadas que revestem o intestino. De acordo com Simpson-Morgan & Smeaton (1972) existe uma lenta modificação naquelas células para que o intestino permaneça permeável às proteínas por um longo período. Entretanto, após o nascimento, a taxa de modificação celular aumenta rapidamente e se inicia o processo de “fechamento intestinal” (RAIDAL et al., 2000). A razão pela qual o potro prematuro pode ter deficiência na transferência passiva de anticorpos pode ser devida ao fato de que a égua com menos de 320 dias de gestação, não possui tempo suficiente ou estímulo hormonal para a produção do colostro.

2.5. Métodos de determinação do estado imunitário

Existem muitas técnicas laboratoriais que podem ser utilizadas para avaliar o estado imunitário das diversas espécies animais. Através da determinação das gamaglobulinas séricas, obtém-se uma ótima condição para apreciar se ocorreu adequada transferência de imunoglobulinas colostrais.

A eletroforese é um método eficiente para detectar as gamaglobulinas séricas. Através deste método separam-se os componentes protéicos do soro sanguíneo e colostrar, em diferentes frações (JEFFCOTT, 1974b). A proteína total pode ser determinada pelo método do biureto (Gornall et al. apud ANNINO & GIESE, 1978) ou por refratometria (VIOR et al., 1973), sendo este último pouco preciso.

Outro método para indicar a concentração de imunoglobulinas é a Turvação pelo Sulfato de Zinco (TSZ) (KUNKEL, 1947). Este método envolve a precipitação de proteínas imunológicas, usando 6mL de solução de sulfato de zinco livre de dióxido de carbono ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) na concentração de 208 mg/litro com 0,1mL de soro-teste. Para cada amostra sérica

testada utiliza-se um controle composto de água destilada, que substitui a solução de sulfato de zinco. Os tubos-teste e controle permanecem em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente procedendo-se imediatamente a leitura em espectrofotometro. A solução padrão é composta por 3 mL de uma solução de cloreto de bário (1,15 g de $BaCl_2 \cdot 2H_2O/100mL$) dissolvidos em 97 mL de uma solução de ácido sulfúrico 0,2 N). Quando avaliada sob as mesmas condições de temperatura do TSZ esta solução fornece uma leitura de turvação equivalente a 20 unidades de turvação (uT) e uma concentração de IgG de aproximadamente 400 mg/dL (RUMBAUGH et al., 1978 e 1979). No Brasil, o referido teste foi recomendado por Silva et al. (1984) após compará-lo com a prova do biureto e eletroforese para avaliar os níveis de proteína sérica na égua e no potro imediatamente após o nascimento (antes da ingestão do colostro) e no colostro da égua. O soro do potro também foi avaliado 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a primeira ingestão do colostro constando que o teste permite o diagnóstico de transferência de Ig colostrálica a partir de seis horas após a ingestão do colostro. Num período relativamente curto de tempo, o TSZ já fazia parte da rotina de vários criatórios de cavalos de corrida do Rio Grande do Sul, por ser um método seguro, rápido e simples para o diagnóstico da transferência de Ig sérica no potro. No início deste século, seu uso também se expandiu para outras raças e regiões do país.

Por imunodifusão radial simples pode-se determinar individualmente imunoglobulinas IgG, IgG (T), IgM, IgA e AI (imunoglobulinas agregadas), porém este método requer maior período de trabalho laboratorial comparado a outros testes, o que limita seu uso (McGUIRE & CRAWFORD, 1972). Através do método de imunodifusão simples em tubo (ROUSE & INGRAM, 1970) pode-se também determinar a concentração das imunoglobulinas IgG, IgG (T) e IgM.

A técnica imunoenzimática (Elisa), emprega imunoglobulinas marcadas com enzimas, com a 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 é um exame que requer anticorpos e reagentes específicos, tempo, equipamentos e habilidade laboratorial, representando alto custo para a aplicação a campo (ERHARD et al., 2001; METZGER et al., 2006).

A imunoturbidimetria determina quantitativamente por imunoprecipitação a imunoglobulina IgG presente no soro. As imunoglobulinas formam com o anti-soro específico um complexo insolúvel, produzindo turbidez, cuja intensidade aumenta a absorbância e é proporcional a concentração de IgG na amostra (KILLINGSWORTH & SAVORY, 1971; FERRIS & McCUE, 2009).

O infravermelho (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) tem a capacidade de caracterizar amostras biológicas. A radiação infravermelha é transmitida através da amostra, fazendo a leitura dos seus constituintes. Esta tecnologia é muito valiosa como ferramenta diagnóstica e já foi testada experimentalmente para o diagnóstico da FTIP, com ótimos resultados (RILEY et al., 2007).

2.6. Fatores que influenciam na reação da turvação pelo sulfato de zinco

A reação do sulfato de zinco e do soro é tempo e temperatura dependente, McEwan e colaboradores (1970) demonstraram que quanto maior a temperatura da solução teste, mais rápido ocorre a reação esperada (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito do tempo e temperatura na turvação da reação entre o sulfato de zinco e o soro.

<i>Temperatura</i> (° C)	<i>Tempo (minutos)</i>			
	15	30	60	120
6	12,8	15,1	15,8	16,6
20	14,7	17,4	18,6	21,2
25	16,8	22,0	24,9	27,6
31	30,3	34,6	38,4	40,6
37	41,6	42,8	44,0	46,7

A determinação de imunoglobulinas através da turvação pelo sulfato de zinco deve ser avaliada de 15 a 60 segundos após a mistura do soro e a solução-teste. Além de 60 segundos o sulfato de zinco reage com outras globulinas além das imunoglobulinas (LeBLANC et al., 1990).

A baixa temperatura da solução-teste causa uma reação retardada, ou seja, a turvação é mais lenta causando um possível falso negativo (McEWAN et al., 1970). O falso positivo pode ocorrer quando a leitura do teste é realizada após 60 segundos da reação e quando o sulfato de zinco reage com as outras proteínas do soro (LeBLANC et al., 1990).

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

Pesquisa Veterinária Brasileira

Sensibilidade e especificidade do teste da turvação pelo sulfato de zinco em potros neonatos

Endrigo Pompermayer, Mara Iolanda Batistella Rubin

2011

Sensibilidade e especificidade do teste da turvação pelo sulfato de zinco em potros neonatos

Endrigo Pompermayer^{1*} Mara I. B. Rubin²

ABSTRACT.- Pompermayer, E. & Rubin, M. I. B. [**Sensitivity and specificity of the zinc sulfate turbidity test in newborn foals.**] Sensibilidade e especificidade do teste da turvação pelo sulfato de zinco em potros neonatos.

Passive immunity acquired by the newborn foal through the colostrum is essential to prevent perinatal infections. The aim of this study was to establish the sensitivity and specificity of the zinc sulfate turbidity test (ZST) 12 hours after first suckling for the detection of immunoglobulins (IgG) to indicate or not the failure of passive immunity transfer. There was no difference in the ZST results obtained from blood collected at 12 (n=110) and 18 (n=38) hours, confirming that the test may be performed as early as 12 hours after the first colostrum intake. When compared to the single radial immunodiffusion test, the ZST test showed 76.50%, 95.65% and 94.68% sensitivity and 93.75%, 93.94% and 75.92% specificity, respectively, for a standard of 400, 600 and 800 mg dL⁻¹ of immunoglobulins (IgG). The results of the ZST test, i.e. according to label instructions, performed 12 hours after the first suckling at 37°C is a reliable diagnostic tool for detecting IgG levels in newborn foals.

INDEX TERMS: equine, IgG, immunoglobulin, colostrum, ZST, passive immunity.

¹ Médico Veterinário, Acadêmico de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM. E-mail: epompermayer@gmail.com *Autor para correspondência.

² Médico Veterinário, Doutor, Professora Titular do Departamento de Clínica de Grandes Animais da UFSM.

RESUMO.- A imunidade passiva adquirida pelo potro neonato através da ingestão do colostro é essencial para a prevenção das infecções neonatais. O objetivo deste trabalho foi determinar a sensibilidade e a especificidade do teste da turvação pelo sulfato de zinco (TSZ) 12 horas após a primeira ingestão de colostro para detecção de imunoglobulinas G (IgG) para indicar ou não a deficiência de transferência da imunidade passiva. Não houve diferença nos resultados do teste TSZ com amostras séricas de potros PSC coletadas 12 (n=110) ou 18h (n=38) após a primeira ingestão do colostro, confirmando que o teste pode ser conduzido 12h após a ingestão de colostro. Quando comparado com a imunodifusão radial simples, o teste TSZ apresentou sensibilidade de 76,50%, 95,65% e de 94,68% e especificidade 93,75%, 93,94% e de 75,92%, para padrões de 400, 600 e 800mg dL⁻¹ de IgG, respectivamente. Assim, o TSZ é um valioso teste para o diagnóstico no campo, desde que sejam seguidas estritamente as indicações do fabricante, especialmente quanto à temperatura. O teste pode e deve ser realizado 12 horas após a primeira mamada, pois apresenta bom índice de precisão.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: equino, IgG, imunoglobulina, colostro, TSZ, imunidade passiva.

INTRODUÇÃO

A imunidade do potro recém-nascido é obtida quase exclusivamente através da absorção de anticorpos colostrais por células especializadas do intestino delgado (Earle 1935). A absorção das macromoléculas pelas células intestinais não é seletiva e sua absorção máxima parece ocorrer três a seis horas após a primeira mamada (Jeffcott 1974). A concentração de anticorpos no colostro, durante o seu período de síntese, é muito mais elevada do que a do soro sanguíneo, o que reforça a preferência pela aplicação de colostro por via oral como fonte suplementar de imunoglobulinas em potros imunodeficientes (LeBlanc et al. 1990, Chavatte et al. 1998; Erhard et al. 2001). A duração da secreção do colostro na égua é curta e seus

níveis de imunoglobulina caem rapidamente após as primeiras mamadas (Jeffcott 1979). Potros que atingem nas 24h de vida níveis de IgG iguais ou superiores a 800mg dL^{-1} tem a transferência de imunidade passiva (TIP) considerada satisfatória, com níveis entre 800 e 400mg dL^{-1} é considerada transferência parcial de imunidade passiva (TPIP), e níveis abaixo de 400mg dL^{-1} é considerada falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) (Giguère & Polkes 2005). O diagnóstico da FTIP é, rotineiramente, realizado 18h após o parto (Crisman & Scarratt 2008), muito próximo do encerramento da absorção intestinal nos potros. Se realizado 12h após o parto seria possível avaliar a absorção da imunidade colostrar mais precocemente e, se necessário, corrigi-la com a administração de colostro por via oral (Silva et al. 1984, Axon & Palmer 2008).

A imunodifusão radial simples (IDRS) permite a determinação direta, objetiva e individual das imunoglobulinas, e é considerado o teste-padrão de referência para a determinação de imunoglobulinas no soro. Entretanto requer um processamento laboratorial mais demorado (18 a 24 horas), praticamente impedindo sua utilização para quando se quer tratar a tempo, por via oral, potros imunodeficientes (McGuire & Crawford 1972, Silva et al. 1984, Baird et al. 1987, Young & Lunn 2000).

O método da turvação pelo sulfato de zinco (TSZ) é o método indireto, subjetivo, de eleição para essa avaliação (Hofsmaess 2001). Há muitos anos ele é utilizado na rotina de diversos haras, porém médicos veterinários experientes questionam sua eficiência, fato que motiva a realização de mais pesquisas.

Este estudo teve por objetivo avaliar a sensibilidade e especificidade do teste de Turvação pelo Sulfato de Zinco como método diagnóstico precoce da transferência de imunidade passiva em potros recém-nascidos; verificar a viabilidade de seu uso 12h após a primeira mamada e como a manipulação das amostras sanguíneas e a aplicação do teste no campo podem alterar a turvação.

MATERIAL E MÉTODOS

O sangue de 110 potros Puro Sangue de Corrida recém-nascidos foi coletado totalizando 148 amostras pertencentes a oito criatórios da região sul do Estado do Rio Grande do Sul. O teste da turvação pelo sulfato de zinco era utilizado na rotina dos haras há mais de 20 anos. Em oito criatórios (n=110) o sangue foi colhido 12h após a primeira mamada e em dois haras a coleta foi efetuada às 12 e às 18h (n=38) após a primeira ingestão do colostro. Foram colhidos 8mL de sangue dos potros cujo soro foi separado após a retração do coágulo. Imediatamente após o teor de imunoglobulinas foi avaliado pelo teste da TSZ³. A amostra excedente foi congelada a -20°C para posterior quantificação de IgG e reavaliação dos soros pelo TSZ. As amostras de soro permaneceram criopreservadas por até sete meses.

O teste da TSZ foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Silva et al. (1984, 1988). No entanto, as amostras-teste foram comparadas ao padrão de sulfato de bário³ correspondente a 40 unidades de turvação. A temperatura da solução teste foi a ambiente (-1,2 a 32,3°C) e a leitura da TSZ foi conduzida a partir de 15 segundos. Para efeito do diagnóstico da situação imunológica, o resultado da avaliação do soro dos potros pelo TSZ[®] foi distribuído em dois grupos, conforme o grau de turvação: turvação inferior ao padrão (<pTSZ), considerada transferência de imunidade insatisfatória e turvação igual ou superior ao padrão (≥pTSZ), esta última tida como satisfatória. Posteriormente, no laboratório, as amostras foram descongeladas e o teste TSZ foi repetido. Nesta etapa foram testadas diferentes temperaturas da solução-teste (20, 25, 30, 34 e 37°C), definindo-se a em 37°C a temperatura padrão para a execução da leitura do teste TSZ que foi realizado em 15 a 60 segundos. A IgG de cada amostra descongelada foi quantificada em mg dL⁻¹ de soro através

³ EMBRYOLAB (Laboratório de Embriologia Animal), Prédio 97, Bloco 4, Ala Sul, Sala 428. Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000. Bairro Camobi. 97.105-900 Santa Maria/RS, BR.

da imunodifusão radial simples (IDRS)⁴. Este teste foi considerado como referência (Baird et al 1987, Young & Lunn 2000). Os soros-teste da TSZ foram comparados a três pontos de corte, correspondentes a 800mg dL⁻¹ (PC=800), 600mg dL⁻¹ (PC=600) e 400mg dL⁻¹ (PC=400) de IgG.

Para as análises considerou-se eficiência a exatidão da operação; sensibilidade como a probabilidade do teste acima do padrão na presença da transferência de imunidade passiva (TIP); especificidade como a probabilidade do teste abaixo do padrão na ausência da TIP; valor preditivo positivo como a probabilidade de um potro com o teste acima do padrão ter TIP; valor preditivo negativo como a probabilidade de um potro com o teste abaixo do padrão ter FTIP.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria, cujo processo esta registrado sob número 81/2009.

Análise estatística

A diferença entre a concentração de IgG determinada 12 e 18h após a primeira ingestão do colostro foi analisada utilizando o teste “t” de Student para amostras pareadas, incluindo cada potro no modelo estatístico. As variáveis foram testadas para normalidade com o teste de Shapiro-Wilk e normalizadas por raiz quadrada. As análises foram efetuadas com pacote estatístico JMP⁵, considerando a diferença significativa quando a probabilidade de erro tipo alfa foi inferior a 5%.

⁴ Equine IgG RID Kit, VMRD Inc, Pullman, Wash, USA.

⁵ SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

RESULTADOS

Os níveis séricos de IgG (Figura 1) verificados pela imunodifusão radial simples no sangue colhido 12 e 18h após a primeira ingestão de colostro nos 38 potros foram semelhantes.

A prevalência da falha parcial da transferência de imunidade ($800 > \text{IgG} \geq 400 \text{ mg dL}^{-1}$), na população estudada (n=110) foi de 20,49% e da falha total ($\text{IgG} < 400 \text{ mg dL}^{-1}$) foi de 4,27%.

A aplicação do teste TSZ no laboratório (Tabela 1) evidenciou desempenho superior ao realizado na rotina dos haras (Tabela 2). A melhor reação da solução-teste foi com temperatura de 37°C.

DISCUSSÃO

A concentração sérica de IgG determinada no soro dos potros 12 e 18h após a ingestão de colostro reforça a indicação de conduzir o teste da TSZ 12h após a primeira mamada, quando há tempo adequado para efetuar o tratamento nos casos de falha na transferência da imunidade passiva, ou seja, melhor aproveitamento da absorção de macromoléculas pelo intestino.

A falha parcial na transferência de imunidade da população estudada (20,49%) e falha total (4,27%) corrobora os achados de Clabough et al. (1989), LeBlanc et al. (1990) e Riley et al. (2007) que relatam níveis aceitáveis de falha na transferência da imunidade passiva entre 3 e 24%.

O teste da TSZ executado no ambiente laboratorial apresentou sensibilidade de 76,50% e especificidade de 93,75% usando o padrão de $\text{IgG} < 400 \text{ mg dL}^{-1}$ e 94,68% e 75,92%, respectivamente usando o padrão de $\text{IgG} < 800 \text{ mg dL}^{-1}$ (Tabela 1). A sensibilidade e a especificidade do teste da TSZ já foram definidas anteriormente por Daves & Giguère (2005)

indicando 88,90% e 79,40% para concentrações de $\text{IgG} < 400 \text{mg dL}^{-1}$, 81% e 56,90% para $\text{IgG} < 800 \text{mg dL}^{-1}$, respectivamente. A variação existente na sensibilidade e especificidade é atribuída à natureza subjetiva do teste e as condições em que ele é realizado (LeBlanc et al. 1990, Daves & Giguère 2005).

A leitura da turvação das amostras-teste na solução de sulfato de zinco neste estudo foi efetuada em um intervalo de 15 a 60 segundos após a mistura do soro com a solução de sulfato de zinco, enquanto no teste utilizado por Daves & Giguère (2005) o precipitado da solução foi analisado após uma hora. LeBlanc e colaboradores (1990) já descreveram que o tempo ideal para a reação é de 15 a 60 segundos, pois a precipitação de globulinas, além das imunoglobulinas, ocorre no período de uma hora, favorecendo a ocorrência de falsos positivos pela reação das demais proteínas.

O acompanhamento clínico dos potros demonstrou que aqueles com níveis de $\text{IgG} \geq 600 \text{mg dL}^{-1}$ não adoeceram, sugerindo boa proteção imunológica. Neste ponto de corte (600mg dL^{-1} de IgG) o teste da TSZ (Tabela 1) foi mais fidedigno para detectar a transferência de imunidade. Rumbaugh e colaboradores (1979) consideraram concentrações de $\text{IgG} \geq 400 \text{mg dL}^{-1}$ como transferência de imunidade passiva adequada. Em 1990, LeBlanc et al. identificaram a concentração de $\text{IgG} = 400 \text{mg dL}^{-1}$ como nível crítico, indicando este nível como o limite para se adotar medidas corretivas nos potros recém-nascidos nos criatórios da Flórida, USA, com clima quente e úmido. Giguère & Polkes (2005) recomendam que potros com IgG entre $400\text{-}800 \text{mg dL}^{-1}$, devem ser tratados apenas quando apresentarem alterações no exame clínico ou laboratorial. A sanidade do potro com FTIP depende muito do ambiente. Mantidos em instalações limpas, ventiladas e com a lotação ideal e clima agradável estão menos propensos a doenças (Silva et al. 1984, LeBlanc 2001).

A baixa sensibilidade e especificidade do teste TSZ determinado pela análise sorológica dos potros nos haras é consequência do elevado número de diagnósticos falso

negativos. O falso negativo não compromete a resistência imune do potro, uma vez que o tratamento para falha de transferência passiva é a reposição de imunoglobulinas. O tratamento realizado com plasma intravenoso deve ser realizado nos primeiros três dias, o nível sérico de IgG quando aplicado um litro de plasma de boa qualidade, aumenta 200-400mg dL⁻¹ (Sprayberry 2003). No entanto, o tratamento desnecessário causa estresse na contenção do potro e representa perda econômica quando o plasma é usado como tratamento. A causa principal do diagnóstico falso negativo nos haras é a baixa temperatura da solução de sulfato de zinco no momento do teste, o que retarda a reação, já que ela é tempo e temperatura dependente (McEwan et al. 1970). A maioria dos nascimentos concentra-se no inverno, período em que a temperatura ambiente está muito abaixo da ideal para a realização do teste, logo, a solução teste, para oferecer resultados mais acurados, deve ser aquecida em banho-maria à temperatura de 37°C.

O teste de transferência de imunidade para o potro recém-nascido permite diagnóstico a partir de 6h após a primeira ingestão de colostro (Silva et al. 1984). LeBlanc et al. (1990) e Hofsaess (2001) recomendam a determinação da transferência de imunidade passiva 9h após a ingestão do colostro. O diagnóstico precoce da FTIP permite a suplementação com colostro criopreservado dos potros com transferência insatisfatória (Silva et al. 1984, LeBlanc et al. 1990, Hofsaess 2001, Ferris & McCue 2009). Considerando que o colostro possui teor de imunoglobulinas muito superior ao plasma (Chavatte et al. 1998, Erhard et al. 2001), o seu uso para reposição de imunoglobulinas é o tratamento de eleição, pois reduz o estresse sofrido pelo potro, aumenta a eficiência do tratamento e diminui os seus custos.

CONCLUSÕES

O TSZ[®] pode ser indicado como meio diagnóstico seguro para a avaliação da transferência passiva de imunidade, da égua para o potro, 12h após a primeira mamada devido

a sua sensibilidade e especificidade, quando se usa um ponto de corte de 600mg dL^{-1} e a leitura for realizada entre 15 e 60 segundos após a mistura do soro do potro com a solução de sulfato de zinco, à temperatura de 37°C . O diagnóstico precoce efetuado 12 h após a primeira mamada permite a instituição de tratamento por via oral (colostró de boa qualidade) rápido e eficiente. Variações no tempo de leitura e na temperatura em que o teste é realizado podem comprometer o diagnóstico.

REFERÊNCIAS

- Axon J.E. & Palmer J.E. 2008. Clinical pathology of the foal. *Vet. Clin. Equine*. 24:357-385.
- Baird A.N., Pugh D.G., Rupp G.P., Shull J.W. & Field R.W. 1987. Detection of immunoglobulin G in the neonate. *J. Equine Vet. Sci.* 7:124-129.
- Chavatte P., Clément F., Cash R. & Grongnet J.F. 1998. Field determination of colostrum quality by using a novel, practical method. In: Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. 44:206-209.
- Clabough D.L., Conboy H.S. & Roberts M.C. 1989. Comparison of four screening techniques for the diagnosis of equine neonatal hypogammaglobulinemia. *J Am Vet Med Assoc.* 194:1717-1720.
- Crisman M.V. & Scarratt W.K. 2008. Immunodeficiency disorders in horses. *Vet Clin Equine*. 24:299-310.
- Davis R. & Giguère S. 2005. Evaluation of five commercially available assays and measurement of serum total protein concentration via refractometry for the diagnosis of failure of passive transfer of immunity in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 227:1640-1645.

- Earle I.P. 1935. Influence of the ingestion of colostrum on the proteins of the blood sera of young foals, kids, lambs and pigs. *J. Agric. Res.* 51:479-490.
- Erhard M.H., Luft C., Remler H.P. & Stangassinger M. 2001. Assessment of colostral transfer and systemic availability of immunoglobulin G in new-born foals using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 85:164-173.
- Ferris R.A. & McCue P.M. 2009. How to Use a quantitative turbidimetric immunoassay to determine immunoglobulin G concentrations in neonatal foals. In: Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. 55:45-47.
- Giguère S. & Polkes A.C. 2005. Immunologic disorders in neonatal foals. *Vet. Clin Equine.* 21:241-272.
- Hofsass F.R. 2001. Time of antibody absorption in neonatal foals. *Journal of Equine Veterinary Science.* 21(4):158-159.
- Jeffcott L.B. 1974. Studies on passive immunity in the foal. II. The absorption of ¹²⁵I-labelled PVP (polyvinyl pyrrolidone) by the neonatal intestine. *J. Comp. Pathol.* 84:279-289.
- Jeffcott L.B. 1979. Aspectos práticos a respeito da imunidade passiva do potro recém-nascido. In: *Ciclo Internacional de Clínica Veterinária Equina, II, São Paulo. Anais...*, São Paulo, Ed. Gráfica Cairu, p.263.
- LeBlanc M.M., Hurtgen J.P. & Lyle S. 1990. A modified zinc sulfate turbidity test for the detection of immune status in newborn foals. *Equine Veterinary Science.* 10(1):36-39.
- LeBlanc M.M. 2001. Update on passive transfer of immunoglobulins in the foal. *Pferdeheilkunde.* 17(6):662-665.
- McEwan A.D., Fisher E.W., I. E. Selman I.E. & Penhale W.J. 1970. A turbidity test for the estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. *Clin. Chim. Acta.* 27:155-163.

- McGuire T.C. & Crawford T.B. 1972. Identification and quantitation of equine serum and secretory immunoglobulin A. *Infect. Immun.* 6:610-615.
- Riley C.B., McClure J.T., Low-Ying S. & Shaw R.A. 2007. Use of fourier-transform infrared spectroscopy for the diagnosis of failure of transfer of passive immunity and measurement of immunoglobulin concentrations in horses. *J Vet Intern Med.* 21:828–834.
- Rumbaugh G.E., Ardans A.A., Ginno D. & Trommershausen-Smith A. 1979. Identification and treatment of colostrum-deficient foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174(3):273-276.
- Silva C.A.M., Rubin M.I.B., Waihrich F.L. & Pelegrini J.L.M. 1984. Diagnóstico da imunidade passiva adotiva adquirida através do colostro no potro recém-nascido. *Pesq. Vet. Bras.* 4(1):11-15.
- Silva C.A.M., Silva J.F.S., Alda J.L, Silva J.H.S. & Rubin M.I.B. 1988. Diagnóstico imediato da imunodeficiência do potro recém-nascido. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 12(4):203-212.
- Sprayberry K.A. 2003. Neonatal transfusion medicine: the use of blood, plasma, oxygen-carrying solutions, and adjunctive therapies in foals. *Clinical Techniques in Equine Practice.* 2(1):31-41.
- Young K.M. & Lunn D.P. 2000. Immunodiagnostic testing in horses. *Vet. Clin. North. Am. Equine. Pract.* 16:79–103.

LEGENDAS

Figura 1: Média dos níveis de IgG sérica detectada por Imunodifusão Radial Simples às 12 e 18h após a primeira ingestão de colostro em 38 potros recém-nascidos, pertencentes a dois criatórios da raça Puro Sangue de Corrida ($P < 0,05$).

Tabela 1: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste da Turvação pelo Sulfato de Zinco determinado por Imunodifusão Radial Simples, comparando-se três pontos de corte de imunoglobulinas séricas de potros recém-nascidos de oito criatórios da raça Puro Sangue de Corrida. Teste conduzido em laboratório com amostras séricas congeladas.

Tabela 2: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste da Turvação pelo Sulfato de Zinco determinado por Imunodifusão Radial Simples, comparando-se três pontos de corte de imunoglobulinas séricas de potros recém-nascidos de oito criatórios da raça Puro Sangue de Corrida. Teste conduzido nos haras.

Figura 1

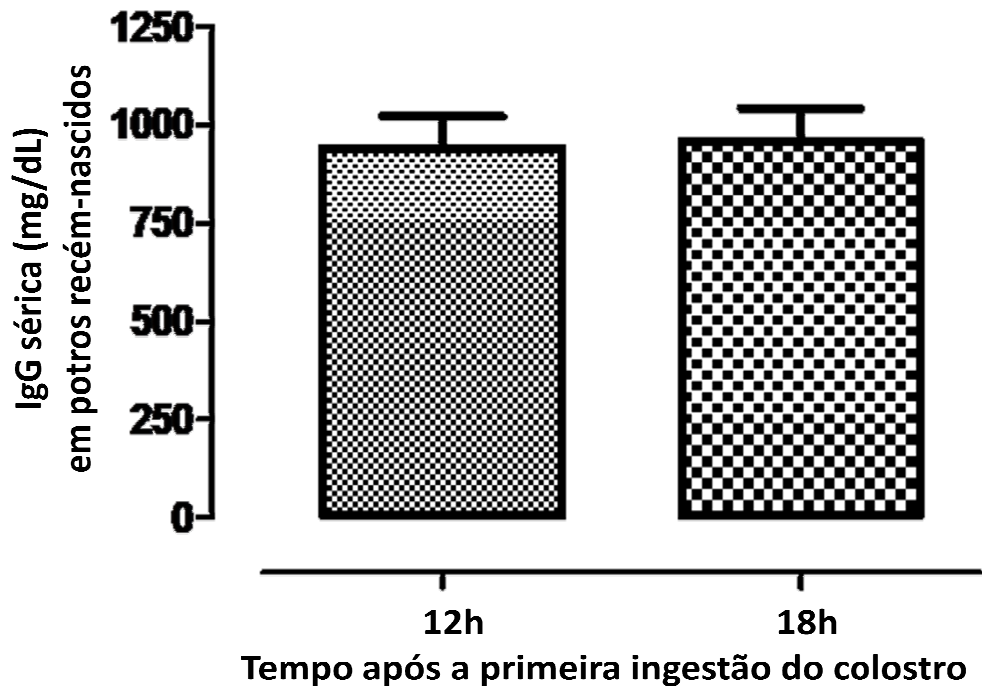


Tabela 1

Variável	Ponto corte=800	Ponto corte=600	Ponto corte=400
	n=148	n=148	n=148
Eficiência (%)	97,29	99,45	73,72
Sensibilidade (%)	94,68	95,65	76,50
Especificidade (%)	75,92	93,94	93,75
Valor preditivo positivo (%)	87,25	98,21	99,02
Valor preditivo negativo (%)	89,13	86,11	32,60

Tabela 2

Variável	Ponto corte=800	Ponto corte=600	Ponto corte=400
	n=148	n=148	n=148
Eficiência (%)	98,27	81,77	55,98
Sensibilidade (%)	75,79	68,70	65,16
Especificidade (%)	74,55	78,79	100
Valor preditivo positivo (%)	83,72	91,86	100
Valor preditivo negativo (%)	64,06	41,94	25,80

4. CONCLUSÕES

O TSZ[®] é um meio diagnóstico seguro para a avaliação da transferência passiva da imunidade da égua para o potro 12 horas após a primeira ingestão de colostro.

Os níveis de IgG sérica não diferiram entre as 12 e 18 horas após a primeira ingestão de colostro.

O teste da TSZ apresentou alta sensibilidade e especificidade usando o ponto de corte de 600mg dL^{-1} , boa capacidade em detectar a transferência de imunidade passiva ($\text{IgG} \geq 800\text{mg dL}^{-1}$) e precisão na determinação da transferência parcial da imunidade passiva.

O teste da TSZ é seguro desde que a leitura do mesmo seja efetuada entre 15 e 60 segundos após a mistura do soro a solução de sulfato de zinco à temperatura de 37°C . Variações no tempo de leitura e na temperatura em que o teste é realizado podem comprometer o resultado.

5. REFERÊNCIAS

ANNINO, J. S.; GEISE, R. S. Proteínas. In: _____. **Química Clínica, Princípios e Métodos**. 4 ed. São Paulo, Ed. Manole. 440p. 1978. Cap.15, p.191-211.

AXON, J. E.; PALMER J. E. Clinical pathology of the foal. **Vet. Clin. Equine**. v.24 p.357-385, 2008.

BAIRD A. N. et al. Detection of immunoglobulin G in the neonate. **J. Equine Vet. Sci.** v.7, p.124-129, 1987.

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

BRUNER, D. W. et al. Passive immunity in the newborn foal. **Cornell Vet.**, v.38: p.363-366, 1948.

BRUNER, D. W. et al. Further studies on hemolytic icterus in foals. **Am. J. Vet. Res.**, v.11: p.22-25, 1950.

CHAVATTE, P. et al. Field determination of colostrum quality by using a novel, practical method. In: **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**. v.44, p.206-209, 1998.

CLABOUGH, D.L. et al. Comparison of four screening techniques for the diagnosis of equine neonatal hypogammaglobulinemia. **J Am Vet Med Assoc**. v.194, p.1717-1720, 1989.

CLÉMENT, F. et al. Efficiency of IgG absorption in the foal. **Theriogenology**. v.58, p.805-808, 2002.

CRISMAN, M. V.; SCARRATT, W. K. Immunodeficiency disorders in horses. **Vet Clin Equine**. v. 24, p.299-310, 2008.

CHUCRI, T. M. et al. A review of immune transfer by the placenta. **J. Reprod. Immunol.** v.87, p.14-20, 2010.

DAVIS, R.; GIGUÈRE, S. Evaluation of five commercially available assays and measurement of serum total protein concentration via refractometry for the diagnosis of failure of passive transfer of immunity in foals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 227, p.1640-1645, 2005.

EARLE, I.P. Influence of the ingestion of colostrum on the proteins of the blood sera of young foals, kids, lambs and pigs. **J. Agric. Res.**, v.51: p.479-490, 1935.

ERHARD, M. H. et al. Assessment of colostral transfer and systemic availability of immunoglobulin G in new-born foals using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system. **J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.** v.85, p.164-173, 2001.

FERRIS, R. A.; McCUE, P. M. How to Use a quantitative turbidimetric immunoassay to determine immunoglobulin G concentrations in neonatal foals. In: **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners.** v.55, p.45-47, 2009.

GIGUÈRE, S.; POLKES, A. C. Immunologic disorders in neonatal foals. **Vet. Clin Equine.** v. 21, p.241-272, 2005.

HALLIDAY, R. The effect of steroid hormones on the absorption of antibody by the young rat. **J. Endocrinol.**, v.18, p.56-57, 1959.

HOFSAESS, F. R. Time of antibody absorption in neonatal foals. **J. Equine Vet. Sci.** v.21, n°4, 2001.

JEFFCOTT, L.B. Duration of permeability of the intestine to macromolecules in the newly-born foal. **Vet. Rec.**, v.88: p.340-341, 1971.

JEFFCOTT, L.B. Passive immunity and its transfer with special reference to horse. **Biol. Rev.** v.47: p.439-464, 1972a.

JEFFCOTT, L.B. Observation on parturition in crossbred pony mares. **Equine Vet. J.** v.4: p.209-213, 1972b.

JEFFCOTT, L.B. Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. **Equine Vet. J.**, v.6 (3): p.109-115, 1974a.

JEFFCOTT, L.B. Studies on passive immunity in the foal. I. Y-Globulin and antibody variations associated whit the maternal transfer of immunity ond onset of active immunity. **J. Comp. Pathol.**, v.84: p.93-101, 1974b.

JEFFCOTT, L.B. Studies on passive immunity in the foal. II. The absorption of 125 I-Labelled PVP (Polyvinyl pyrrolidone) by the neonatal intestine. **J. Comp. Pathol.**, v.84: p.279-289, 1974 (c).

JEFFCOTT, L.B. Aspectos práticos a respeito da imunidade passiva do potro recém-nascido. In: CICLO INTERNACIONAL DE CLÍNICA VETERINÁRIA EQUINA, II, São Paulo. **Anais...**, São Paulo, Ed. Gráfica Cairu, p.263, 1979.

JEFFCOTT, L.B.; JEFFCOTT, T.J. Studies on passive immunity in the foal. III. The characterization and significance of neonatal proteinúria. **J. Comp. Path.** v.84, p.455-465, 1974.

KAUFMAN, W.C. Pediatric medicine. **Vet. Clin. North Am.** v.3, p.251-254, 1973.

KILLINGSWORTH, L. M; SAVORY, J. Automated immunochemical procedures for measurement of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in human serum. **Clin. Chem.** v.17, p.936-940, 1971.

KUNKEL, H.G. Estimation of alterations of serum gamma globulin by a turbidimetric technique. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.** v.66, nº1, p.217-224, 1947.

LeBLANC, M. M. et al. A modified zinc sulfate turbidity test for the detection of immune status in newlyborn foals. **Equine Vet. Sci.** v.10, nº 1, p.36-39, 1990.

LeBLANC, M. M. Update on passive transfer of immunoglobulins in the foal. **Pferdeheilkunde.** v.17, ed.6, p.662-665, 2001.

LESTER, G. D. Maturity of the neonatal foal. **Vet Clin Equine.** v.21, p.333–355, 2005.

MACPHERSON, M. L. Diagnosis and treatment of equine placentitis. **Vet Clin Equine.** v.22, p.763–776, 2006.

MACPHERSON, M. L.; BAILEY, C. S. A clinical approach to managing the mare with placentitis. **Theriogenology.** v.70, p.435–440, 2008.

McDOUGALL, D.F. Immunoglobulin metabolism in the neonatal foal. **J. Reprod. Fert. Suppl.**23, p.739-742, 1975.

McEWAN, A. D. et al. A turbidity test for the estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. **Clin. Chim. Acta.** v.27, p.155-163, 1970.

McGUIRE, T. C.; CRAWFORD, T. B. Identification and quantitation of equine serum and secretory immunoglobulin A. **Infect. Immun.**, v.6, p.610-615, 1972.

McGUIRE, T. C.; CRAWFORD, T. B. Passive immunity in the foal. Measurement of immunoglobulin classes and specific antibody. **Am. J. Vet. Res.** v.34, p.1299-1303, 1973.

McGUIRE, T. C. et al. Hypogammaglobulinemia predisposing to infection in foals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.166: p.71-75, 1975.

McGUIRE, T. C. et al. Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.170, p.1302-1304, 1977.

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.

METZGER, N. et al. Usefulness of a Commercial Equine IgG Test and Serum Protein Concentration as Indicators of Failure of Transfer of Passive Immunity in Hospitalized Foals. **J Vet Intern Med.** v.20, p:382–387.

PARISH, S.M. Ruminant immunodeficiency diseases. In: _____. **Large animal internal medicine.** 2 ed. St. Louis: Mosby, 1996. p.1857-1860.

PAYNE, L. C.; MARSH, C. L. Gama globulin absorption in the baby pig: the nonselective absorption of heterologous globulins and factors influencing absorption time. **J. Nutr.** v.76, p.151-158, 1962.

PFEIFFER, N. E. et al. Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulphate turbidity, serum electrophoresis, and refratometer methods. **Am. J. Vet. Res.** v.38, p.693-698, 1977.

PIERCE, A. E. B-Lactoglobulins in the urine of the newborn suckled calf. **Nature**, v.188, p.940-941, 1960.

PIERCE, S. W. Foal care from birth to 30 days: a practitioner's perspective. In: **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, v.49, p.13-21, 2003.

POPPIE, M. J.; McGUIRE, T. C. Combined immunodeficiency with failure of colostral immunoglobulins transfer in foals. **Vet. Rec.**, v.99, p.44-46, 1976.

RAIDAL, S. L. 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**, v.46, p.263, 2000.

REID, J. F. S.; MARTINEZ, A. A. A modified refractometer method as a practical aid to the epidemiological investigation of disease in the neonatal ruminant. **Vet. Rec.** v.96, p.177-179, 1975.

REJNEK, J. et al. The presence of IgG and IgM in full term horse umbilical cord sera. **Immunochemistry**. v.10, p.397-399, 1973.

RIDDLE, W.T. Preparation of the mare for normal parturition. In: **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, v.49, p.1-5, 2003.

RILEY, C. B. et al. Use of fourier-transform infrared spectroscopy for the diagnosis of failure of transfer of passive immunity and measurement of immunoglobulin concentrations in horses. **J Vet Intern Med**. v.21, p.828-834, 2007.

ROSSDALE, P. D. Modern concepts of neonatal disease in foals. **Equine Vet. J.** v.4, p.117-128, 1972.

ROUSE, B. T.; INGRAM, D.G. The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk. **Immunol.** v.19, p.901-907, 1970.

ROUSE, B.T. The immunoglobulins of adult equine and foal sera: a quantitative study. **Br. Vet. J.**, v.127, p.45-51, 1971.

RUMBAUGH, G.E. et al. Measurement of neonatal equine immunoglobulins for assessment of colostral 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.**, v.172: p.321-325, 1978.

RUMBAUGH, G. E. et al. Identification and treatment of colostrum-deficient foals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.174: p.273-276, 1979.

RUBIN, M. I. B. Imunoglobulinas séricas do potro recém nascido, da égua e do colostro, com referência especial ao diagnóstico da imunidade passiva adquirida através do colostro. Santa Maria, UFSM, Dissertação de Mestrado, 35p. 1982.

SILVA, C. A. M. et al. Diagnóstico da imunidade passiva adotiva adquirida através do colostro no potro recém-nascido. **Pesq. Vet. Bras.**, v.4, n.1, p.11-15, 1984.

SILVA, C. A. M. et al. Diagnóstico imediato da imunodeficiência do potro recém-nascido. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.12 (4): p.203-212, 1988.

SIMPSON-MORGAN, M. W.; SMEATON, T. C. The transfer of anti-bodies by neonates and adults. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v.16: p.355-386, 1972.

SPRAYBERRY K.A. Neonatal transfusion medicine: the use of blood, plasma, oxygen-carrying solutions, and adjunctive therapies in foals. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v.2(1), p.31-41, 2003.

TIZARD, I. R. Imunidade no feto e no recém-nascido. In: _____. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6ª ed. São Paulo: Roca, 2002. Cap. 19, p. 233-246.

VAERMAN, J. P. et al. Studies on the IgA systems of the horse. **Immunol.** v.21, p.443-454, 1971.

VIOR, C. et al. Investigations on immunoglobulins in calves. **Arch. Vet.** v.2, p.13-22, 1973.

WILSHER, S. et al. Factors associated with failure of Thoroughbred horses to train and race. **Equine Vet. J.** v.38 (2), p.113-118, 2006.

YOUNG, K. M.; LUNN D. P. Immunodiagnostic testing in horses. **Vet. Clin. North. Am. Equine. Pract.** v.16, p.79-103, 2000.