

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

PROTEINOGRAMA E CONCENTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G
SÉRICOS EM POTROS, DO NASCIMENTO AOS TRINTA DIAS DE VIDA,
TRATADOS COM PLASMA

CAMPO AMOR VIEIRA DA CUNHA NETO

BOTUCATU - SP

Julho de 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

PROTEINOGRAMA E CONCENTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G
SÉRICOS EM POTROS, DO NASCIMENTO AOS TRINTA DIAS DE VIDA,
TRATADOS COM PLASMA

CAMPO AMOR VIEIRA DA CUNHA NETO

Dissertação apresentada junto ao
programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária para a obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Secorun
Borges

Coorientador: Prof. Dr. João Pessoa
Araújo Júnior

BOTUCATU - SP
Julho de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cunha Neto, Campo Amor Vieira da.

Proteinograma e concentração de imunoglobulina G séricos em potros, do nascimento aos trinta dias de vida, tratados com plasma / Campo Amor Vieira da Cunha Neto. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Coorientador: João Pessoa Araújo Júnior

Capes: 50501062

1. Eletroforese. 2. Imunoglobulinas. 3. Ensaio de imunoabsorção enzimática. 4. Plasma sanguíneo. 5. Técnicas imunoenzimáticas. 6. Potros.

Palavras-chave: Eletroforese; Ensaio imunoenzimático; Imunoglobulina; Plasma; Potro.

Nome do Autor: Campo Amor Vieira da Cunha Neto.

Título: Proteinograma e concentração de imunoglobulina G séricos em potros, do nascimento aos trinta dias de vida, tratados com plasma

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu.

Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu.

Prof. Dr. Diego José Zanzarini Delfiol
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária - FAMEV
Universidade Federal de Uberlândia - UFU - Uberlândia, MG.

Data da defesa: 04 de julho de 2016.

A minha amada família!

Aos meus pais, Neri Vieira da Cunha e Maria Nicen da Cunha, pela vida, amor incondicional, apoio, exemplos de vida, fé e ensinamentos que sempre me conduzem pelos caminhos da vida.

Aos meus irmãos e “baluartes”, Vlademir, Edna (in memoriam) e Neri Hellen, pelo apoio, amor, cumplicidade e compreensão em tantos momentos.

A minha doce esposa e grande amor da minha vida, Analice, pelo amor, força, cumplicidade, carinho e paciência inenarráveis.

Vocês são minha fonte de inspiração, meu porto seguro!

AGRADECIMENTOS

A Santíssima trindade, pelo dom da vida, imenso amor e misericórdia, por der-me forças nesta caminhada. Também à Maria, Santa Mãe de Deus na imagem de Nossa Senhora de Aparecida, pois tudo em minha vida está em suas mãos santas e misericordiosas.

Ao professor e orientador Dr. Alexandre Secorun Borges, pela recepção, pela amizade, pelos ensinamentos, confiança, força, gentileza e principalmente pelo apoio e oportunidades.

Ao professor e coorientador Dr. João Pessoa Araújo Júnior, por “abrir as portas de seu laboratório”, possibilitando o desenvolvimento das análises necessárias. Também pela amizade, pelos ensinamentos, gentileza e confiança.

A professora Dra. Maria Julia B. Felipe do Departamento de Ciências Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell, por gentilmente ceder anticorpo equino utilizado neste trabalho.

Ao professor Dr. José Paes de Oliveira Filho, pelo suporte na realização do proteinograma realizado, pelo convívio, pela amizade, apoio e colaboração sempre disponíveis, pelos ensinamentos, gentileza e atenção. Também a sua esposa, Andreza, pelo apoio e gentileza.

A professora Dra. Regina Kiomi Takahira e toda sua equipe do laboratório de patologia clínica, pelo apoio e prestatividade no processamento do plasma utilizado nos potros, pela atenção e carinho, amizade e ensinamentos.

Ao professor Dr. José Carlos de Oliveira Pantoja, pela contribuição nas análises estatísticas, pela amizade, ensinamentos e atenção.

Ao professor Dr. Diego José Zanzarini Delfiol, pelo imenso incentivo e ajuda na idealização deste projeto, pelos ensinamentos e por sempre se disponibilizar a ajudar no que fosse necessário, pela amizade e atenção.

Ao Médico Veterinário Dr. Hilton de Oliveira Rodrigues, o qual tive a honra e satisfação de trabalhar em equipe, pela oportunidade profissional, pelo apoio e incentivo em continuar estudando, pelos ensinamentos e pela confiança depositada, pela amizade, pelos vários conselhos que nunca irei esquecer. Também à sua esposa dona Sandra e suas queridas filhas, pela gentileza e amizade.

Ao Haras Beverly Hills Stud, que sob a propriedade do Sr. Alessandro Arcangeli e direção do Sr. Eduardo Guimarães permitiu que este estudo fosse realizado. A todos os colaboradores do administrativo, da casa Sede e do campo, que me acolheram e me ajudaram nos três anos que lá permaneci.

A todos os encarregados e cavaleiros do Beverly Hills Stud, especialmente Lucas Paula Leite e Vanderlei Melo, pela ajuda em vários momentos de coleta, pelo auxílio e companhia em tantos partos, de noite ou de dia, sob sol ou chuva, muito obrigado pela amizade, pela dedicação e pelo respeito aos cavalos.

Ao médico veterinário Dr. André Anzanello T. A. Carrascoza, o qual tive a honra e satisfação de trabalhar em conjunto. Pelas ótimas horas de discussões clínicas, as quais eram excelentes oportunidades de aprendizado. Pelos vários conselhos que me ajudaram tanto na vida profissional quanto pessoal, pela amizade, pela gentileza e atenção durante todo o tempo de convívio.

As pós-graduandas Dra. Tais Fukuta da Cruz, Dra. Michely Tenório da Silva e Msc. Camila Dantas Malossi, pela paciência e dedicação pelas quais me ajudaram em vários procedimentos deste trabalho, pela amizade e gentileza. Também aos demais “colegas de bancada”, Claudia Tozato, Jacqueline Kurissio, Eduardo Fiorati, Mariana Vaz, Ariani Almeida e Ricardo Seiti, pela amizade, apoio e todos os momentos de convivência.

Aos Pesquisadores e pós-graduandos do IBTEC, comunidade “Ibetequiana”, sob a supervisão dos Professores Dr. Deilson, Dr. Jaime e Dr. Paulo Ribolla, por disponibilizar seus equipamentos e material de estudo e trabalho, pelas agradáveis e produtivas conversas nos momentos do cafezinho.

Aos Colegas de Pós-graduação, pessoal da “salinha” que apesar de pequena no espaço físico é enorme na capacidade de acolhimento, Mariana Palumbo, Didier Cagnini, Diego Delfiol, Giovane Olivo, César Irineudo, Peres Ramos, Mariana Herman, Juliana Mira, Juliana Gama, Aline Angella, Danilo Andrade e Anelize Trecenti, pela amizade, pelo apoio e pela agradável convivência.

Aos companheiros de casa, Diego Zanzarini Delfiol, Giovane Olivo e César Irineudo Tavares de Araújo, parceiros, padrinhos de casamento e irmãos de coração, por me acolherem em Botucatu e me oferecerem uma extensão do meu lar, pela amizade, pela gentileza, pelos vários momentos juntos e tantas

conversas, pelos ensinamentos, pela força, pelo apoio e pelos exemplos de dignidade.

Aos queridos casais de amigos, Rodrigo Cavalcanti e Vanessa Kultz, Didier e Eduarda, Diego e Elisa, Giovane e Juliana, Peres e Aline Bronzato, pelo apoio e vários momentos juntos, sempre com muita alegria.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Leandro Américo, Luiz Mattos, Dietrich Pizzigatti, Emiliano Cisneros, Juliana Alonso, Carlos Ramires Neto, Thiago Nitta, Fábio e Vitor Hugo, pela amizade, incentivo e agradável convivência.

Ao Dr. Rodrigo Rosa Giampietro por me ajudar num dos momentos mais difíceis da minha vida, pela amizade, pelo incentivo, por tantos momentos, sempre com muita alegria e disposição. Também, à toda equipe da faculdade de medicina de Botucatu, sob supervisão da professora Dra. Vânia Nunes.

Aos médicos veterinários, Dr. Peres Ramos Badial, Msc. Guilherme Sicca Lopes Sampaio e Msc. Fabio Sossai Possebon, pelo auxílio em dúvidas estatísticas, pela atenção, amizade e gentileza.

Aos docentes do Departamento de Clínica Veterinária, Dr. Roberto Calderon Gonçalves, Dr. Simone Biagio Chiacchio e Dr. Rogério Martins Amorim e também aos docentes do Departamento de Cirurgia Veterinária, Dr. Carlos Alberto Hussni, Dra. Ana Liz Garcia Alves, Dr. Celso Antônio Rodrigues e Dr. Marcos Jun Watanabe, pelo incentivo inenarrável, pelo apoio, ensinamentos e amizade, por todos os momentos de convivência que sempre agregam muito na minha vida pessoal e profissional.

Aos membros do conselho de pós-graduação em medicina veterinária, Dr. Hélio Langoni, Dr. José Carlos F Pantoja, Dr. Alexandre Secorun Borges, Dra. René Laufer Amorin, Dra. Jane Megid, Dr. Marcio Garcia Ribeiro, Dra. Regina Kiomi Takahira, Dra. Noeme Sousa Rocha, à Doutoranda Carmen Bolaños e ao secretário Carlos Pazini pelo apoio, pelo carinho, respeito e compreensão em tantos momentos.

Aos colaboradores de apoio administrativo da seção de pós-graduação, que sob a supervisão de Carlos Pazini Junior, sempre estiveram prontos para resolver as questões burocráticas necessárias a correta condução do programa, pelo carinho e atenção.

As secretárias do Departamento de Clínica Veterinária, Marlene Dias de Camargo e Izabel Cristina Castro e aos funcionários da Clínica de Grandes Animais Cesar Leme e Marco Antônio Simão pela colaboração, amizade e carinho durante todo o tempo de convivência.

Aos residentes, graduandos e estudantes de iniciação científica da clínica e também da cirúrgica de grandes animais, pela amizade, gentileza e atenção em tantos momentos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado, possibilitando a execução deste projeto.

Aos Cavalos, por me fazerem vivenciar um sonho de infância, animais de nobreza e força inefáveis, que me ensinam, a cada dia, observar, servir e lutar.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Média \pm desvio padrão (DP) das variáveis etológicas e score APGAR de potros da raça puro sangue inglês e dados da placenta de suas respectivas mães logo após o nascimento (n=20)	22
TABELA 2 - Mediana (mínimo/máximo) das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) e temperatura retal (TR) de potros da raça puro sangue inglês, em cinco momentos, do nascimento aos 30 dias de vida (n=20) ...	23
TABELA 3 - Média \pm desvio padrão da Proteína Total (dois métodos), Albumina e Globulinas Totais dos potros (n=20), nos cinco momentos, e éguas (n=20) no momento do parto.....	24
TABELA 4 - Medidas de tendência central e dispersão da proteína total (PT) obtida através de analisador bioquímico e das frações proteicas - Alb. (albumina), α 1 (alfa1-globulina), α 2 (alfa2-globulina), β (beta-globulina) e γ (gamaglobulina) - dos potros (n=20) nos cinco momentos e éguas progenitoras (n=20) no momento do parto.....	26
TABELA 5 - Média \pm desvio padrão das concentrações de IgG sérico de potros em cinco momentos, suas respectivas mães e do plasma no momento da transfusão, obtidos através da técnica de S-ELISA e IDRS...	30
TABELA 6 - Média \pm Desvio Padrão da densidade específica, índice BRIX e concentração de IgG, estimado por S-ELISA e IDRS, de amostras de colostro de éguas colhidas imediatamente após o parto, antes da primeira mamada dos potros (n=20)	33

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Representação gráfica da forte correlação positiva entre os valores de PT obtidos através de refratômetro manual e analisador bioquímico com coeficiente de correlação de Pearson 0,92 e $P < 0,0001$ 23
- FIGURA 2 - Configuração do laudo de leitura das frações proteicas séricas de um potro clinicamente saudável no M1 (A) e M2 (B). Os picos representam, da esquerda para a direita, as bandas albumina, α_1 , α_2 , β e γ -globulinas no gel de agarose. Notar a fração gamaglobulina virtualmente inexistente em M1 (A) onde o potro ainda não havia mamado o colostro..... 25
- FIGURA 3 - Representação gráfica da relação entre concentração sérica de proteína total (PT), obtidas pelas técnicas de refração e biureto em analisador bioquímico, e a fração γ -globulina pela técnica de eletroforese em gel de agarose dos potros com 10 horas de vida ($P < 0,0001$)..... 27
- FIGURA 4 - Eletroforese SDS-PAGE 12,5%: Caracterização de imunoglobulina G a partir da identificação de suas cadeias leve e pesada, 25 KDa e 50 KDa respectivamente. Colunas 2 e 3 - amostras IgG equina e IgG de coelho anti-equina, respectivamente; colunas 4 a 9 – soro albumina bovina; Coluna 10 - padrão de peso molecular..... 28
- FIGURA 5 - Correlação entre concentrações de IgG humana (1 $\mu\text{g/ml}$; 0,75 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 0,125 $\mu\text{g/ml}$; 0,062 $\mu\text{g/ml}$) e seus respectivos valores de absorvância, obtidos pela técnica de BCA, utilizados para análise de regressão linear e construção da equação da reta padrão, para determinação das concentrações relativas de IgG equina e IgG de coelho anti-IgG equino..... 28
- FIGURA 6 - Representação gráfica da relação positiva entre as concentrações de IgG nas amostras de soro e plasma avaliadas por S-ELISA e IDRS ($r=0,72$ e $P < 0,0001$)..... 29
- FIGURA 7 - Histograma mostrando a diferença dos valores de IgG sérico dos potros entre os momentos de avaliação obtidos através de S-ELISA e IDRS. M1= logo após o parto, previamente mamar colostro; M2= dez horas de vida; M3= 24 horas de vida (previamente transfusão plasma); M4= 48 horas de vida (24 horas após transfusão plasma); M5= 30 dias de vida..... 30
- FIGURA 8 - Histograma mostrando a diferença entre os valores de IgG sérico e colostrado, das éguas progenitoras, obtidos através de S-ELISA e IDRS..... 31
- FIGURA 9 - Representação gráfica da relação entre concentração sérica de proteína total (PT), obtidas em analisador bioquímico e refratômetro, e IgG sérico pela técnica de IDRS (A) e S-ELISA (B) nos cinco momentos ($P < 0,01$)..... 32

FIGURA 10 - Representação gráfica da correlação entre concentração de globulina total e IgG sérico pela técnica de IDRS (A) e S-ELISA (B) nos cinco momentos de avaliação dos potros.....	32
FIGURA 11 - Representação gráfica da correlação entre concentração da fração γ -globulina e IgG sérico pela técnica de IDRS e S-ELISA nos cinco momentos de avaliação dos potros.....	32
FIGURA 12 - Representação gráfica da correlação entre concentração de IgG sérico dos potros no M2 e colostrar das éguas no momento do parto pela técnica de S-ELISA (A) e IDRS (B).....	33
FIGURA 13 - Representação gráfica da correlação positiva entre a densidade das amostras de colostro avaliado colostrômetro portátil de índice BRIX e colostrômetro de densidade específica ($r=0,44$ e $P=0,05$)...	34
FIGURA 14 - Representação gráfica da relação entre densidade, avaliado por colostrômetro de índice BRIX (A) e densidade específica (B) e concentração de IgG avaliado por S-ELISA e IDRS, das amostras de colostro.....	34

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Justificativa.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Resposta imune inata e adaptativa.....	5
2.1.1 Produção de anticorpos	7
2.2 Transferência de Imunidade passiva.....	7
2.2.1 Colostro	8
2.2.2 Plasma hiperimune	9
2.3 Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva.....	10
2.3.1 Métodos indiretos.....	10
2.3.2 Métodos diretos.....	11
3 OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4 MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1 Animais.....	13
4.1.1 Exame físico e registro dos dados etológicos	13
4.2 Esquema de imunização.....	14
4.2.1 Doadores	14
4.2.2 Éguas PSI	14
4.3 Colheita, Extração e Administração do Plasma.....	14
4.4 Colheita das amostras.....	15
4.5 Proteína total e frações proteicas séricas.....	15
4.6 Determinação da concentração de IgG total	16
4.6.1 Purificação IgG equino utilizado como padrão	16
4.6.2 Antissoro e anticorpo de coelho anti-IgG equino	17
4.6.3 Imunodifusão Radial Simples (IDRS)	18
4.6.4 Ensaio Imunoenzimático “Sanduíche” (S-ELISA)	18
4.6.4.1 Teste de repetibilidade S-ELISA.....	20
4.7 Análise do Colostro	20
4.8 Análise estatística.....	21
5 RESULTADOS	22

5.1 Dados clínicos dos potros e éguas	22
5.2 Proteína Total, Albumina e Globulinas Totais.....	23
5.3 Proteinograma (Eletroforese em gel de agarose).....	24
5.4 Determinação IgG total.....	27
5.4.1 Anticorpos purificados	27
5.4.2 Teste de repetibilidade do S-ELISA.....	28
5.4.3 Determinação IgG total por IDRS e S-ELISA	29
5.5 Densidade e concentração de IgG colostrado.....	33
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	42
8 AGRADECIMENTO	42
9 REFERÊNCIAS.....	43
10 TRABALHO CIENTÍFICO.....	53
11 ANEXOS	72
ANEXO 1 - Normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira	72
ANEXO 2 - Valores individuais de proteína total (mg/dL), determinado por refratômetro manual dos potros nos cinco momentos de avaliação.....	74
ANEXO 3 - Valores individuais de proteína total (mg/dL), determinado por analisador bioquímico, dos potros nos cinco momentos de avaliação.....	75
ANEXO 4 - Valores individuais de Albumina (mg/dL), determinado por analisador bioquímico, dos potros nos cinco momentos de avaliação.....	76
ANEXO 5 - Valores individuais das frações proteicas (mg/dL), obtidas através de eletroforese em gel de agarose, dos potros no M1 de avaliação.....	77
ANEXO 6 - Valores individuais das frações proteicas (mg/dL), obtidas através de eletroforese em gel de agarose, dos potros no M2 de avaliação.....	78
ANEXO 7 - Valores individuais das frações proteicas (mg/dL), obtidas através de eletroforese em gel de agarose, dos potros no M3 de avaliação.....	79
ANEXO 8 - Valores individuais das frações proteicas (mg/dL), obtidas através de eletroforese em gel de agarose, dos potros no M4 de avaliação.....	80
ANEXO 9 - Valores individuais das frações proteicas (mg/dL), obtidas através de eletroforese em gel de agarose, dos potros no M2 de avaliação.....	81
ANEXO 10 - Valores individuais de IgG séricos dos potros (mg/dL), nos cinco momentos, determinados por S-ELISA e IDRS.	82
ANEXO 11 - Valores individuais da Proteína Total (refratômetro e bioquímico), Albumina (bioquímico) e cinco frações proteicas obtidas através de eletroforese em gel de agarose do grupo de éguas (mg/dL).....	83
ANEXO 12 - Valores individuais do IgG Total, determinado por S-ELISA e IDRS das amostras de soro e colostro do grupo de éguas (mg/dL), bem como os valores de densidade específica e índice BRIX (%) das amostras de colostro.....	84

ANEXO 13 - Valores individuais da Proteína Total (refratômetro e bioquímico), cinco frações proteicas obtidas através de eletroforese em gel de agarose e IgG total obtido por S-ELISA e IDRS do plasma (utilizado nos potros) dos quatro doadores (mg/dL).....	85
---	----

CUNHA NETO, C.A.V. **Proteinograma e concentração de imunoglobulina G séricos em potros, do nascimento aos trinta dias de vida, tratados com plasma.** Botucatu, 2016. 99p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o proteinograma e concentrações séricas de IgG em potros do nascimento aos trinta dias, antes e depois de mamarem colostro e serem tratados com plasma, bem como avaliar a qualidade do colostro e plasma utilizados. Para tal, foram utilizados 20 potros e suas respectivas mães, além de quatro animais doadores (plasma). Foram colhidas amostras de sangue dos potros em cinco momentos (M1= zero, M2= dez, M3= 24, M4= 48 horas e M5= 30 dias de vida), sangue e colostro das éguas progenitoras no momento do parto. Amostras de soro plasma foram avaliadas a concentrações de Proteína total e albumina por técnica colorimétrica e refratometria. O proteinograma sérico foi obtido através de eletroforese em gel de agarose e a globulina total foi estimada através de cálculo matemático. Foi avaliado a densidade do colostro e a concentração de IgG total de todas as amostras foi determinada por imunodifusão radial e um novo sistema de ELISA. A média \pm desvio padrão da concentração sérica de IgG dos potros de M1 a M5, avaliada por ELISA, foi de 15 ± 8 mg/dL, 2.408 ± 608 mg/dL, 2.282 ± 783 mg/dL, 2.364 ± 784 mg/dL e 1.414 ± 586 mg/dL, respectivamente. Os níveis séricos e colostrais de IgG (ELISA) foram de 1746 ± 505 mg/dL e 7714 ± 2619 mg/dL, respectivamente. Houve forte correlação entre os resultados obtidos por ambos os testes de quantificação de IgG. Todavia, a concentração de IgG determinada por IDRS, em todas as amostras, foram estatisticamente maiores que as determinadas por ELISA.

Palavras-chave: Potros; Imunoglobulina G; Eletroforese; Ensaio Imunoenzimático.

CUNHA NETO, C.A.V. **Proteinogram and serum immunoglobulin G concentration in foals from birth to thirty days of life, treated with plasma.** Botucatu, 2016. 99p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the protein concentrations and serum IgG in foals birth to thirty days, before and after suckling colostrum and be treated with plasma and evaluate the quality of colostrum and plasma used. Twenty foals and their mothers were used and four donor animals (plasma). colts blood samples were collected in five times (M1 = zero, M2 = ten M3 = 24, M4 = 48 hours and M5 = 30 days), blood and colostrum progenitor mares at foaling. Plasma Serum samples were evaluated for total protein and albumin concentrations and refraction by colorimetric technique. Serum protein was obtained by electrophoresis on an agarose gel, and the total globulin has been estimated through mathematical calculation. The mean \pm standard deviation of the serum IgG concentration of foals group of the M1 at M5, measured by ELISA, was of 15 ± 8 mg / dL, $2,408 \pm 608$ mg / dL, $2,282 \pm 783$ mg / dL, $2,364 \pm 784$ mg / dl and 1.414 ± 586 mg / dL, respectively. Serum IgG and colostral (ELISA) were 1.746 ± 505 mg / dL and 7714 ± 2619 mg / dl, respectively. There was a strong correlation between the results obtained by both quantitation of IgG tests. However, the IgG concentration determined by SRID in all samples were statistically higher than those obtained by ELISA.

Key Words: Foal; Immunoglobulin G; Electrophoresis; Enzyme-Linked Immunosorbent assay.

1 INTRODUÇÃO

O rebanho nacional de equinos em 2011 era de 5.510.601 animais e somados ao rebanho de asininos e muares o total de equídeos no Brasil era de 7.754.692 animais (IBGE, 2012). De acordo com estimativas da FAO (2013) o Brasil possui o quarto maior rebanho de equinos do mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos (10.350.000 animais), México (6.356.000 animais) e China (6.337.380 animais).

O complexo do agronegócio equídeo no Brasil movimenta cerca de R\$ 7,3 bilhões somente com a produção de cavalos. O rebanho envolve mais de 30 segmentos e gera aproximadamente 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2015).

Para a manutenção desse complexo é fundamental que se realize um manejo sanitário de neonatos para evitar que doenças possam prejudicar a criação. Isso se deve principalmente pelo fato dos potros nascerem com um sistema imune imaturo e serem agamaglobulinêmicos. Assim, são susceptíveis a várias infecções onde se destacam as respiratórias por patógenos ambientais (JEFFCOTT, 1974; WOHLFENDER et al., 2009).

A fonte mais adequada de imunoglobulinas para o potro neonato é a ingestão de quantidade adequada de colostro materno, de preferência até 12 horas de vida, pois após esse período a absorção das mesmas é bastante reduzida ou nula (RAIDAL et al., 2005).

Potros devem ser avaliados quanto a transferência adequada de imunidade passiva e aqueles que não possuem níveis adequados de imunoglobulinas até nove horas de vida devem receber uma quantidade extra de colostro oriundo da mãe ou banco de colostro (HOFSAESS, 2001).

É difícil para a maioria dos proprietários realizar a identificação de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) antes de 12 horas de vida na maioria dos potros. Isso por que não é recomendado oferecer colostro, substituto de colostro ou plasma por via oral em potros com mais de 18 horas de vida. Desta forma é necessária a administração por via intravenosa de plasma hiperimune na tentativa de aumentar os níveis séricos de imunoglobulinas (PARADIS, 2006).

Já foi observado que potros tratados com plasma hiperimune possuíam maior titulação de imunoglobulinas em relação ao grupo não tratado, além de

uma menor ocorrência de infecção respiratória em propriedades consideradas endêmicas para broncopneumonia por *R. equi* (TYLER-MCGOWAN et al., 1997; HIGUCHI et al., 1999).

1.1 Justificativa

A ocorrência de FTIP segundo a literatura internacional varia de 16% a 37,8% (TYLER-MCGOWAN et al., 1997; MCCLURE et al., 2003) e a maior complicação desta condição é a susceptibilidade destes animais a enfermidades infecciosas, principalmente as que acometem o sistema respiratório causando grandes prejuízos a equinocultura (PEIRÓ et al., 2002). Deve-se suspeitar de FTIP em qualquer potro neonato que apresente infecções recorrentes ou septicemia (KNOTTENBELT et al, 2004).

Os dados na literatura nacional sobre quantidades de imunoglobulinas transferidas por meio da administração de plasma e a ocorrência de problemas clínicos relacionados à imunidade de animais tratados e não tratados são escassos.

Segundo um estudo em propriedades de cavalos Puro Sangue inglês realizado por Frey Júnior (2006) os percentuais de morbidade e mortalidade de potros, relacionados a afecções de origens infecciosas ou não, foram de 76,6% e 2,5%, respectivamente, e a morbidade para doenças respiratórias foi de 15,1%. Ribas e colaboradores (2009) identificaram prevalência de 9,5% de enfermidades do sistema respiratório. Meirelles et al (2011) avaliando 118 potros observaram que 58,5% dos animais apresentaram quadro clínico de enterite. Mas nenhum dos autores relacionou os problemas infecciosos com FTIP nos potros.

Apesar de alguns autores sugerirem que as principais afecções de origem infecciosa ocorram ainda na primeira semana de vida dos potros e que medidas preventivas, como a administração de plasma hiperimune, devam ocorrer nesta fase (DE LUCA et al., 2001), não está totalmente esclarecido o quanto de proteínas é possível transferir para potros hígidos ou debilitados com a administração de plasma, principalmente plasma hiperimune produzido sob condições a campo.

Inúmeras propriedades administram o plasma hiperimune por via endovenosa em todos os recém-nascidos de forma empírica, porém os resultados desta conduta ainda geram dúvidas quanto aos seus benefícios. Esta prática possui custo elevado e requer mão de obra especializada, necessitando de mais estudos quanto ao aproveitamento das imunoglobulinas administradas permitindo assim preconizar, ou não, sua administração em todos os animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resposta imune inata e adaptativa

Ao longo da evolução os animais desenvolveram um complexo sistema imune para proteger o organismo contra infecções. Estes mecanismos consistem em sistemas de defesa, unificados, compostos por tecidos, células e moléculas que conferem proteção ao animal hospedeiro a partir de uma dada ameaça (CALLAHAN e YATES, 2014). A exposição do hospedeiro a um micro-organismo ou determinado parasita resulta na indução de respostas imunes dirigidas contra aquele micro-organismo e não afeta os não relacionados (LUNN e HOROHOV, 2001).

A sobrevivência frente a doenças infecciosas depende de um mecanismo de defesa adequado. Isto inclui uma série de barreiras naturais para conter a invasão de microrganismos patogênicos (KNOTTENBELT et al., 2003a).

A pele constitui a primeira grande barreira imunológica frente a microrganismos invasores, proporcionando uma barreira física entre o ambiente, tecidos e órgãos. Outros componentes importantes de resistência são, um pH ácido, a secreção de ácidos graxos e a microbiota natural que coloniza a superfície epitelial (TIZARD, 2004). Da mesma maneira que a pele, as superfícies da mucosa respiratória, gastrointestinal e geniturinária proporcionam uma barreira física contra bactérias e a presença da microbiota normal e muco abundante impedem a colonização. Células epiteliais da mucosa no trato gastrintestinal, respiratório e urogenital secretam substâncias, tais como defensinas que causam bacteriolise e aumentam a opsonização pelos fagócitos (LUNN e HOROHOV, 2001).

Tanto os neutrófilos, que são os primeiros polimorfonucleares a atuarem em um processo de inflamação aguda, quanto os monócitos desempenham um papel importante na imunidade inata (AUFFRAY et al., 2007). Além de fagocitose e lise bacteriana por meio de vias oxidativas, de acidificação, e mecanismos enzimáticos, essas células secretam numerosas substâncias, tais como citocinas, fatores de crescimento, lactoferrina e interferon, que podem induzir quimiotaxia, aumentar a fagocitose, bacteriolise ou inibir a replicação microbiana (YATES, 2014).

Embora tenha sido mostrado que os neutrófilos equinos são funcionais ao nascimento, em comparação com neutrófilos de animais adultos, a fagocitose e a atividade oxidativa são reduzidas nas primeiras duas semanas de vida (DEMMERS et al., 2001; MCTAGGART et al., 2001). Provavelmente a função dos neutrófilos é significativamente prejudicada, antes da absorção das imunoglobulinas colostrais, pela falta de anticorpos circulantes necessários para a opsonização (HIETALA; ARDANS, 1987).

A especificidade da resposta imune adaptativa é o resultado da interação de moléculas específicas, ou antígenos, do invasor com receptores específicos para os antígenos nos linfócitos, especialmente linfócitos T e B, estes últimos secretando anticorpos (CALLAHAN e YATES, 2014). Linfócitos de memória saem da corrente sanguínea em leitos vasculares periféricos, particularmente em tecidos inflamados, e retornam para os linfonodos via vasos linfáticos aferentes. Esta circulação conduz à exposição de linfócitos de memória preparados para os locais mais prováveis de encontro antigênico e permite uma resposta precoce quando há reexposição ao mesmo antígeno (LUNN e HOROHOV, 2001).

A contagem de linfócitos aumenta nos primeiros quatro meses de vida (FRYMUS & SCHOLLENBERGER 1979, BALSON et. al. 1997, FLAMINIO et. al. 1999, SMITH III et. al. 2002). Flamínio e colaboradores (2000) observaram que a proporção de linfócitos B aumenta em relação aos linfócitos T e não verificaram diferença das respostas linfoproliferativas entre potros até quatro meses e equinos adultos.

2.1.1 Produção de anticorpos

A imunoglobulina G (IgG) é o anticorpo mais abundante no soro e colostro de equinos (TIZARD, 2004). Primeiramente foi descrito cinco subclasses de IgG chamadas de IgGa, IgGb, IgGc, IgG(T) e IgG(B), mas atualmente já se conhecem sete subclasses de IgG, que são chamadas de IgG1 a IgG7 (WAGNER, 2006). Das subclasses descritas originalmente a IgGa é correspondente da IgG1, a IgGb corresponde a IgG4 e IgG7, a IgGc a IgG6 e IgG (T) corresponde a IgG3/5 (WAGNER et al., 2002, 2004).

O feto equino pode reponder a antígenos bacterianos e virais aos 200 e 230 dias pós concepção, respectivamente (TIZARD, 2004). Ao nascer potros já possuem níveis detectáveis de IgM e IgG1 antes da ingestão de colostro (SHEORAN et al., 2000). Estas imunoglobulinas continuam sendo produzidas pelo sistema imune do potro. Todavia, os potros são imunoimaturas e dependentes dos anticorpos colostrais nas primeiras semanas de vida (JEFFCOTT, 1972).

Os níveis de IgG colostrais absorvidas vão diminuindo a medida que vão sendo utilizadas ou se degradando. O tempo de meia vida da IgG1, IgG4/7 e IgG3/5 é de 18, 32 e 21 dias, respectivamente (SHEORAN et al., 2000).

A função imune básica destas subclasses de IgG é a de ativação de complemento (LEWIS et al., 2008) sendo fundamental na proteção sistêmica e/ou de mucosas contra infecções por Influenza virus (NELSON, 1998), Herpes virus equino tipo I (GOODMAN et al., 2006) e tipo IV (MIZUKOSHI et al., 2002) e *Rhodococcus equi* (LOPEZ et al., 2002).

2.2 Transferência de Imunidade passiva

As imunoglobulinas, ou anticorpos, são as principais proteínas do sistema imune, são as opsoninas mais eficientes, que ligam as bactérias por meio de receptores nas células fagocíticas para sua ingestão (TIZARD, 2004).

A placentação da égua é do tipo epiteliocorial e assim praticamente impermeável às imunoglobulinas. Por isso, potros são considerados agamaglobulinêmicos ao nascer e como são imaturos quanto a produção de IgG são dependentes da transferência passiva de imunoglobulinas através do

colostro como forma de defesa alternativa (JEFFCOTT, 1974; LEBLANC et al., 1992).

É considerado como adequada uma concentração sérica de IgG > 800 mg/dl nas primeiras 12 horas de vida do potro, abaixo disto é considerado que o neonato teve FTIP. Potros com valores séricos de Ig <400 mg/dl tiveram uma FTIP total e quando as concentrações de Ig séricas estão entre 400-800 mg/dl considera-se uma FTIP parcial (MCGUIRE et al., 1977; BALDWIN et al., 1991; MCCLURE et al., 2003).

A FTIP é associada, há décadas, ao desenvolvimento de doenças infecciosas e septicemia neonatal, especialmente em potros com níveis <400 mg/dL (CLABOUGH et al., 1991; TYLER-MCGOWAN et al., 1997). Estudos epidemiológicos demonstraram que os óbitos podem chegar a 74% em potros com FTIP (HAAS et al., 1996). Assim, há uma recomendação de que potros com índices de Ig < 800 mg/dL nas primeiras nove horas de vida devem ser suplementados com colostro de ótima qualidade (HOFSAESS, 2001).

A FTIP pode ocorrer por falhas na produção, ingestão ou absorção de colostro. Éguas com doença grave no terço final de gestação, placentite, partos prematuros ou gemelares podem ter a produção de colostro comprometida, tanto na quantidade quanto na qualidade colostrais. Neonatos prematuros, com problemas ortopédicos ou rejeitados pelas mães podem não ingerir a quantidade necessária de colostro (GIGUÈRE; POLKES, 2005). Outro fator importante é a capacidade de absorção de imunoglobulinas colostrais pelo epitélio intestinal dos potros. Quanto mais cedo a ingestão melhor, pois a absorção reduz significativamente após 12 horas de vida, caindo de 50% para 28% da quantidade de IgG ingerida (JEFFCOTT, 1974; RAIDAL et al., 2005).

2.2.1 Colostro

Nas duas últimas semanas de gestação a glândula mamária das éguas concentra mais imunoglobulinas a partir do sangue e este evento pode ser detectado pela diminuição de anticorpos séricos. A secreção inicial é mais rica em proteínas e imunoglobulinas, é produzida apenas uma vez e após secretada (12-14 horas pós-parto) as concentrações de ambas decrescem bruscamente. As classes de imunoglobulinas que são transferidas via colostro para os potros

são IgGa, IgGb, IgG(T), IgA (SHEORAN et al., 2000), IgM (KOHN et al., 1989) e também IgE (WAGNER et al., 2006; MARTI et al., 2009).

Logo após o nascimento as concentrações de IgG são maiores e diminuem significativamente, IgM e IgA estão em menor quantidade no início e se mantem em concentrações semelhantes por mais tempo durante a lactação (CSAPÓ-KISS et al., 1995; KNOTTENBELT et al., 2003b)

A concentração de IgG colostrar pode variar de acordo com a raça, idade e número de partos, estando em média em 5033 mg/dL e 6394 mg/dL para éguas das raças Puro Sangue Inglês e Árabe, respectivamente (LEBLANC et al., 1986; ERHARD et al., 2001). Imunoglobulinas podem ser encontradas no soro de potros seis horas após ingerir o colostro e as concentrações séricas atingem o pico entre 13 e 24 horas pós ingestão (JEFFCOTT, 1974; ERHARD et al., 2001; LANG et al., 2007) .

É possível mensurar a qualidade do colostro a campo através de refratômetros portáteis de escala BRUX (BRUX %). Amostras de colostro com leitura BRUX acima de 23% foram consideradas de boa qualidade, pois possuíam valores de IgG >60g/L ao exame de imunodifusão radial (CHAVATTE et al., 1998; CASH, 1999).

2.2.2 Plasma hiperimune

Alguns pesquisadores têm avaliado a eficácia da administração de plasma hiperimune, visando aumentar as concentrações de imunoglobulinas séricas, prevenir possíveis falhas da imunização colostrar e promover imunidade passiva contra agentes bacterianos aumentando a taxa de sobrevivência de potros em unidades hospitalares (PEEK et al., 2006). Martens et al. (1989) constataram que potros submetidos à administração de plasma hiperimune apresentaram maior resistência a infecção experimental por *Rhodococcus equi*.

Em um estudo utilizando 88 potros, Tyler-Mcgowan et al (1997) relatam uma prevalência de 16% e 17% para FTIP parcial e total, respectivamente. Eles observaram uma maior susceptibilidade a doenças de potros com FTIP não tratados com plasma, mas sem diferença estatística devido ao número reduzido de animais utilizados.

Franz et al (1998) avaliaram a cinética de IgG sérica de potros neonatos privados de mamar colostro tratados com produto comercial liofilizado a base de

IgG equino purificado e concluíram que uma dose de 10g/15Kg, por via oral ou endovenosa, foi suficiente para elevar os níveis séricos de IgG em 200-300 mg/dl e 400mg/dL, respectivamente. Todavia, é necessário que produtos, visando aumentar concentração sérica de IgG, quando oferecidos pela via oral sejam administrados o mais cedo possível (antes de dez horas de vida) para melhor absorção das imunoglobulinas (HAMMER et al., 2000).

Há relatos de diminuição da morbidade e mortalidade por *Rhodococcus equi* em potros atribuída à administração endovenosa de plasma hiperimune (HIGUCHI et al., 1999; CASTON et al., 2006).

Segundo McTaggart et al. (2005) o tratamento de potros saudáveis e sépticos com plasma aumentou significativamente os níveis séricos de IgG, além de aumentar a fagocitose por neutrófilos logo após a transfusão e a atividade de explosão oxidativa de neutrófilos (dos potros sépticos) cinco dias após a transfusão. Por outro lado, alguns autores não haviam encontrado diferença significativa da ocorrência de problemas respiratórios causados por *Rhodococcus equi* entre grupos de potros tratados com plasma hiperimune comercial e grupo controle não tratado (GIGUÈRE et al., 2002).

Um perfil imune mais detalhado do tratamento com plasma hiperimune, como exemplo subtipos de Ig e componentes não específicos (proteínas de fase aguda) que contribuem para a proteção de potros neonatos, se faz necessário afim de otimizar o seu potencial na imunoprofilaxia frente a doenças infecciosas (DAWSON et al., 2010).

2.3 Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva

2.3.1 Métodos indiretos

Refratômetros são utilizados para avaliar, de maneira indireta, a qualidade do colostro, bem como as concentrações proteicas séricas de neonatos e adultos, mas apesar de existir uma boa correlação entre proteína total e concentração de IgG em potros, esta técnica não é recomendada como diagnóstico de FTIP devido grande dispersão de resultados (DAVIS; GIGUERE, 2005).

Outros métodos indiretos utilizados para estimar de forma semiquantitativa a concentração de IgG em potros são: turbidez pelo sulfato de

zinco (LEBLANC et. al. 1990, DA LUZ et. al. 1991) e coagulação por glutaraldeído (BEETSON et. al. 1985, CLABOUGH et. al. 1991).

2.3.2 Métodos diretos

O proteinograma é uma forma direta de estimar a concentração de imunoglobulinas, através do fracionamento proteico de amostra biológica numa matriz polimérica por diferença de potencial elétrico (KANEKO et al., 2008). Atualmente utiliza-se eletroforese em gel de agarose, com kits comerciais, para determinar a concentração de até sete frações proteicas em relação a concentração da proteína total de fluidos corpóreos dos equinos (GODOY et al., 2007; RIOND et al., 2009; DI FILIPPO et al., 2010) e correlacionar os níveis séricos de gamaglobulinas em potros com FTIP (FOUCHÉ et al., 2014).

A eletroforese em gel de poliacrilamida é outra técnica de fracionamento proteico amplamente utilizada, pois permite fracionar proteínas com peso molecular de 3-200 kDa (WALKER, 2002) e, desta forma, é possível determinar a concentração de subtipos de gamaglobulinas (FAVERO et al., 2011) e verificar a pureza de proteínas purificadas (SHEORAN; HOLMES, 1996; VARGAS et al., 2015).

A técnica de imunodifusão consiste em utilizar placas com gel de ágar com orifícios onde são depositadas as amostras a serem testadas. Quando se confrontam uma amostra contendo o antígeno contra outra que contém o seu antissoro, as duas amostras difundem uma em direção a outra (imunodifusão dupla) e a reação antígeno-anticorpo forma um precipitado linear no gel (OUCHTERLONY, 1953). Quando a amostra com o antígeno (ex: IgG) difunde num gel com antissoro incorporado o precipitado ocorre de forma centrífuga ao poço onde está a amostra, formando um anel, esta técnica é chama de imunodifusão radial (FAHEY & MCKELVEY 1965, MANCINI et. al. 1965).

A imunodifusão radial é amplamente utilizada para diagnóstico de FTIP em potros, sendo considerada “padrão ouro” por vários pesquisadores (LEBLANC et. al. 1986, GIGUÈRE et. al. 2002, LANG et. al. 2007).

Os imunoensaios enzimáticos (ELISA) envolvem anticorpos ligados a enzimas que, quando num substrato adequado, reagem com substâncias cromógenas produzindo intensidade de cores dependentes da quantidade de anticorpo presente na reação, tornando possível quantificá-los através de

leitores automatizados (CROWTHER, 2009). Atualmente é a técnica de escolha para avaliar concentrações de subtipos de imunoglobulinas antígeno-específicas em laboratórios, pois permitem uma avaliação com alta sensibilidade e especificidade de um grande número de amostras em cada teste (HIGUCHI et. al. 1999, ERHARD et. al. 2001, MARTINS et. al. 2010).

Testes práticos, baseados em imunoenaios enzimáticos, para diagnóstico precoce de FTIP total e parcial a campo, têm sido disponibilizados por empresas e avaliados por vários autores, pois permitem mais agilidade na tomada de decisões de manejo nas propriedades. Pusterla et. al. (2002), utilizando um teste imunoenzimático rápido (SNAP test) encontraram boa acurácia em concentrações de IgG <400 mg/dL e > 800 mg/dL e fraca acurácia em resultados intermediários. Outros estudos de prevalência de FTIP, utilizando o mesmo teste imunoenzimático, encontraram sensibilidade e especificidade que variaram de 81-88% e 90-94,7%, respectivamente. (MCCLURE et. al. 2003, DAVIS & GIGUERE 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar os níveis séricos das frações proteicas e IgG total em potros, do nascimento aos trinta dias de vida, antes e depois de receberem imunidade passiva colostrar e serem tratados com plasma, bem como avaliar qualidade colostrar e do plasma utilizado para tratamento dos potros.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar concentração de IgG total em amostras de soro, plasma e colostro de equinos por meio de um novo teste de Imunoensaio enzimático (ELISA) e também por imunodifusão radial simples.
- Correlacionar concentrações séricas de proteína total e frações proteicas com IgG total sérico de potros neonatos.
- Avaliar a correlação da concentração de IgG colostrar no momento do parto e sérico dos potros nas primeiras horas de vida.

- Avaliar a correlação dos níveis séricos e colostrais de IgG total das éguas PSI no momento do parto.
- Correlacionar os níveis de IgG colostrais com os índices de dois diferentes tipos de colostrômetro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os animais utilizados neste experimento pertenciam a um haras do interior do estado de São Paulo. A realização deste trabalho foi autorizada pelo responsável pela propriedade e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ, UNESP – Campus de Botucatu (protocolo nº 173/2015).

4.1 Animais

Foram utilizadas 20 éguas da raça Puro Sangue Inglês e seus respectivos potros durante uma estação de nascimentos de um haras de criação localizado no estado de São Paulo. Também foram utilizadas quatro fêmeas adultas (três da raça Bretão e uma Percheron), pesando entre 630 e 700kg como doadores de plasma. Todos os animais eram mantidos sob o mesmo sistema de manejo e ambiência, em piquetes com capim *Coast-Cross* e água à vontade, suplementados com ração e sal mineralizado.

Durante os 15 dias que antecederam o parto de cada égua, as mesmas eram diariamente conduzidas para a maternidade onde passavam a noite em observação. Todos os partos foram assistidos e ocorreram em baias maternidade, as quais foram devidamente limpas e desinfetadas no intervalo entre cada parto.

4.1.1 Exame físico e registro dos dados etológicos

Em todos os momentos de colheita das amostras (descritos a seguir) foi realizado exame físico dos potros (frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal).

Os potros foram avaliados ao nascimento quanto ao score APGAR segundo Knottenbelt (2003) e os seguintes dados etológicos foram registrados: a) Potros: Tempo para decúbito externo, levantar, reflexo de sucção, primeira mamada, eliminar mecônio, altura de cernelha e peso; b) Éguas: idade, número

de partos, tempo de gestação, tempo para levantar após o parto, tempo para eliminar a placenta; c) placenta: peso, comprimento e número de torções do cordão umbilical.

Além do exame físico todos os potros foram submetidos a teste para diagnóstico de FTIP através de kit comercial¹, segundo recomendações do fabricante, utilizando-se sangue total colhido da veia jugular externa em tubo a vácuo com EDTA 10 horas após nascimento.

4.2 Esquema de imunização

4.2.1 Doadores

Os animais doadores foram vacinados em dois momentos com intervalo de 30 dias, sendo que em cada momento receberam vacinas contra encefalomielite², rinopneumonite¹, influenza¹, tétano¹, *Rhodococcus equi*³, *E. coli*⁴, *Salmonella*³, *Klebsiella*³, *Streptococcus equi*⁵ e Leptospirose⁶. E após 25 dias da segunda dose foi realizada a colheita de sangue para extração do plasma.

4.2.2 Éguas PSI

As éguas PSI foram vacinadas 45 e 15 dias antes da data prevista para o parto contra *Rhodococcus equi*, *E. coli*, *Salmonella* e *Klebsiella*, além das vacinas do calendário normal de imunização do haras que consistia em vaciná-las no 5º, 7º e 9º meses de prenhez com a vacina comercial contra Herpes vírus I e IV⁷ e anualmente contra encefalomielite¹, herpes vírus I e IV¹, influenza¹, tétano¹, *Streptococcus equi*⁴, raiva⁸ e leptospirose⁵.

4.3 Colheita, Extração e Administração do Plasma.

Após as colheitas de sangue dos doadores, as bolsas de sangue foram encaminhadas ao Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ–UNESP de Botucatu,

¹ SNAP® foal IgG test - IDEXX Lab. Inc. Westbrook, Maine - USA.

² LEXINGTON-8® - Lab. Vencofarma do Brasil. Londrina – PR.

³ RHODOVAC® - Clínica Equina SRL. Cap. Sarmiento – Argentina.

⁴ AUTOVACUNA® - Dr. L. Pompeo S. Arg.

⁵ STREPTOVAC - Sorocaba - SP

⁶ LEPTOEQUUS - Lab. Vencofarma do Brasil. Londrina – PR.

⁷ HERPES-HORSE® - Lab. Vencofarma do Brasil. Londrina – PR.

⁸ BGS-CELL® - Hertape Calier Saúde Animal S/A. Juatuba - MG

centrifugadas e o plasma extraído para a bolsa satélite e congelado (-20°C) num prazo de seis horas após as colheitas do sangue total. Cada potro recebeu 1 litro de plasma, independente do peso do animal, e para isto foi realizada tricotomia, antissepsia e acesso na veia jugular, com cateter endovenoso 16 G acoplado a um equipo de transfusão.

4.4 Colheita das amostras

As amostras de sangue das éguas e seus respectivos potros foram colhidas por venopunção da jugular utilizando coletor com agulha para coleta múltipla - 21G⁹ e acondicionadas em frascos sem anticoagulante e após a retração do coágulo foram centrifugadas (1.800 x g) para obtenção do soro.

Durante o processo de extração de plasma dos doadores foi separado uma alíquota de plasma. Amostras de sangue e colostro das éguas foram colhidas no momento do parto. A colheita de sangue dos potros ocorreu em cinco momentos: M1 - logo após o parto, previamente a primeira mamada do colostro; M2 - com dez horas de vida; M3 - com 24 horas de vida (logo após a colheita foi realizada a transfusão do plasma); M4 - com 48 horas de vida (24 horas após a transfusão do plasma); M5 - aos 30 dias de vida.

Todas as amostras colhidas foram armazenadas em tubos plásticos e congeladas a -20° C até o momento das análises laboratoriais.

Visando respeitar as condições estabelecidas pela propriedade onde foram realizadas as coletas dos dados, não foi possível utilizar um grupo de potros como controle, ou seja, sem receber plasma ou sem mamar colostro, uma vez que isto iria alterar o manejo profilático da propriedade aumentando o risco de problemas infecciosos.

4.5 Proteína total e frações proteicas séricas

A concentração da proteína total (PT) do soro sanguíneo das éguas PSI, seus respectivos potros e os animais doadores foi mensurada através de dois métodos, primeiro utilizando refratômetro manual e depois analisador bioquímico semiautomático¹⁰ usando kit comercial¹¹ para dosagem direta da concentração

⁹ BD Vacutainer® - Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA.

¹⁰ SB 190. CELM Cia. São Caetano do Sul, São Paulo.

¹¹ PROTEINAS TOTAIS Katal® - Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda. Belo horizonte, Minas Gerais.

de proteínas séricas totais através do método colorimétrico de Biureto (Tietz 1970). Utilizando mesmo analisador bioquímico foi avaliado a concentração de albumina das amostras pelo método colorimétrico Verde de Bromocresol¹² (Tietz 1970).

As frações proteicas (Albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas e γ -globulinas) foram obtidas pela técnica de eletroforese em gel de agarose¹³ corado com amido negro (0,1%) em ácido acético a 5%, segundo as técnicas descritas por Naoum (1999) e a leitura das frações proteicas foi realizada em “scanner”¹⁴. O valor de proteína total utilizado para esta técnica foi o obtido pela técnica do biureto em analisador bioquímico.

A concentração da globulina total sérica (GT) das amostras de soro e plasma foram determinadas através dos valores das concentrações de albumina subtraída da proteína total: [Globulina total] = [proteína total] – [Albumina]. Para tal foram utilizados os valores de Albumina e proteína total obtidos por reação colorimétrica em analisador bioquímico.

4.6 Determinação da concentração de IgG total

Para a quantificação de IgG total das amostras de plasma, soro e colostro foram utilizados os métodos de Imunodifusão Radial Simples - IDRS (MANCINI et al., 1965) e Ensaio Imunoenzimático direto “sanduiche” – S-ELISA (ERHARD, et al., 2001), ambos com modificações. Para a realização de tais testes foi necessária a purificação de IgG equino e produção de antissoro anti-IgG equino.

4.6.1 Purificação IgG equino utilizado como padrão

O processo de purificação, avaliação da pureza e quantificação do IgG equino seguiu a técnica descrita por Bollag e colaboradores (1996). Para tal, uma amostra de sangue total de um equino hígado, macho, adulto foi colhida por venopunção da jugular externa e acondicionada em frasco sem anticoagulante, após a retração do coágulo, centrifugou-se a 1500 x g durante dez minutos para obtenção do soro.

¹² ALBUMINA Katal® - Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda. Belo horizonte, Minas Gerais.

¹³ Celmgel® - CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Barueri, São Paulo.

¹⁴ SE-250-Celm® - CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Barueri, São Paulo.

Foi realizada purificação em coluna de afinidade (HiTrap Protein G HP)¹⁵ de 5 ml, utilizando tampão de ligação fosfato de sódio 20mM e pH 7,0 e tampão de eluição Glicina-HCL 0,1M e pH 2,7.

A amostra foi diluída em tampão de ligação na proporção de 1:1 e filtrada em filtro de 0,45µm para retirada de impurezas. A coluna de proteína G foi lavada com tampão de ligação na velocidade de 5ml/minuto durante 30 minutos e então foi realizada a eluição da amostra na velocidade de 5ml/minuto e colhidas em alíquotas que foram acondicionadas em tubos plásticos de 1ml. O pH de cada alíquota foi neutralizado com Tris a 1 mol/L.

Para a caracterização das imunoglobulinas G obtidas, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com azul de coomassie.

Após a realização do SDS-PAGE foram separadas as amostras mais puras (sem bandas adicionais) e realizada a quantificação proteica pelo método de BCA (ácido bicinconínico) e a leitura em espectrofotômetro com absorvância de 562nm. Foi utilizado IgG humano como padrão, as médias das densidades ópticas (D.O.) foram correlacionadas com as concentrações padrão utilizadas (1mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125mg/mL; 0,0625 mg/mL; 0,03125 mg/mL; 0,01562 mg/mL; 0,0781 mg/mL; 0,0390 mg/mL) e a equação gerada pela regressão linear ($R^2=0,9958$) foi utilizada para estimar a concentração de IgG equino purificado.

4.6.2 Antissoro e anticorpo de coelho anti-IgG equino

Segundo técnica descrita por Bollag et. al. (1996) foi utilizado 1mg de IgG equino purificado em 1ml de adjuvante completo de Freund e inoculado por via intramuscular em coelho. Foram realizadas mais quatro aplicações semanais com a mesma concentração proteica em adjuvante incompleto de Freund, alternando as vias de administração subcutânea e intramuscular.

Após dez dias da última aplicação foi realizada a colheita de sangue para obtenção de soro e verificando a reatividade do mesmo contra a IgG equina purificada, por meio da imunodifusão dupla em gel de ágar. Em seguida foi realizado a eutanásia e sangria total do coelho para obtenção do antissoro.

¹⁵ GE Healthcare Bio-Sciences AB – Björkgatan 30 751 84, Uppsala, Sweden.

Uma alíquota do antissoro foi submetida ao mesmo procedimento de purificação de IgG descrito no item 4.7.1. Porém, foi utilizada uma coluna de proteína A, pois esta tem mais afinidade à IgG de coelho que a coluna de proteína G, segundo o fabricante.

4.6.3 Imunodifusão Radial Simples (IDRS)

Foi utilizado antissoro anti-IgG equino (descrito no item 4.7.2) incorporado ao gel de Ágar Noble 1,3% em solução tampão fosfatada (PBS - pH 7,4 0,01M PO_4^{2-} 0,14 Na Cl). Para preparação das placas de poliestireno (cultivo celular) foi incorporado ao gel o antissoro em duas proporções diferentes, 1:60 e 1:40 utilizadas para avaliar amostras de soro dos potros no M1 e demais amostras, respectivamente. Após a polimerização do gel, em temperatura ambiente, foram abertos furos de 2,5 mm de diâmetro para a deposição das amostras teste diluídas em PBS pH 7,4 e amostras de IgG equino utilizadas como padrão de referência¹⁶ com concentrações conhecidas.

As amostras de soro dos potros no M1 foram analisadas sem diluição, as demais amostras de soro e plasma foram diluídas 1:10 e de colostro 1:25.

As medidas dos anéis formados por precipitação nas amostras padrão (concentrações conhecidas) foram utilizadas para estabelecer regressão linear e posterior quantificação em mg/dL das amostras de soro e colostro analisadas.

4.6.4 Ensaio Imunoenzimático “Sanduíche” (S-ELISA)

Para determinar a concentração de IgG das amostras de colostro, soro e plasma foi utilizada técnica descrita por Erhard e colaboradores (2001) com modificações. Foi utilizado anticorpo de coelho anti-IgG equino (item 4.7.2) como captura na concentração de $0,5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ diluído em Tampão Carbonato Bicarbonato (TCB) 0,05M pH 9,6 num volume de 100 μL /poço em microplacas de poliestireno¹⁷. Em seguida, a microplaca foi incubada a 37°C em câmara úmida durante 60 minutos.

Após a adsorção do anticorpo de captura, a microplaca foi lavada cinco vezes com PBS pH 7,4 com 0,05% de *Tween* 20 (PBST), todas as posteriores lavagens da microplaca seguiram o mesmo protocolo. Após lavagem, realizou-

¹⁶ Equine IgG Antibody - VMRD INC, Pullman - WA

¹⁷ Nunc™ Medisorp - Thermo Fisher Scientific Inc.

se a etapa de bloqueio de “ruídos” pela adição de 300 µl/poço de TCB pH 9,6 + 10% Leite em Pó Desnatado (LPD). Após, foi realizada incubação em câmara úmida por 45 minutos a 37°C, em seguida foi realizada nova etapa de lavagem da microplaca com PBST.

As amostras teste e padrão de referência foram diluídas com PBST + 10% de LPD. As amostras de soro de potros do M1 foram diluídas a 2×10^3 , já as amostras de soro e plasma foram diluídas 4×10^4 e de colostro 8×10^4 . Para cada microplaca foi construída uma curva padrão utilizando IgG equino purificado (descrito em 4.7.1) nas concentrações que variaram de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Posteriormente, foi adicionado 100µL/poço das amostras de soro teste e padrão e efetuada incubação da microplaca em câmara úmida a 37°C por 60 minutos.

Após incubação foi realizada lavagem da microplaca e adicionado 100 µL/poço do conjugado Imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG de equino conjugado com peroxidase¹⁸ preparado na diluição 4×10^3 com PBST e 10% de LPD. Essa fase foi incubada durante 60 minutos a 37 °C em câmara úmida. Depois, a microplaca foi lavada, foi adicionado 100µL/poço do substrato cromogênico (2,5 µl de H₂O₂ a 30% +100 µl de Tetrametilbenzidina-TMB a 10 mg/mL em Dimetilsulfóxido-DMSO + 10 mL do Tampão Citrato Acetato 0,1 mol/L pH 6,0) em toda a microplaca. A mesma foi mantida sob agitação constante durante 15 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. A reação colorimétrica foi bloqueada com a solução de HCl 2 mol/L no volume de 50 µl/poço e a leitura da Densidade Óptica (DO) foi realizada em leitora automática¹⁹ em um comprimento de onda de 450 nm contra um branco onde foi colocado apenas o bloqueio, o substrato com cromógeno e o bloqueador da reação colorimétrica. Como controle da reação foi utilizado, em cada microplaca, poços sem amostra, e considerados como satisfatório quando estes apresentaram DO semelhante ao branco.

As DO obtidas, em cada curva padrão, e as respectivas concentrações foram correlacionadas através de regressão polinomial de grau 2 e utilizado a equação quadrática para determinação da concentração de IgG das amostras.

¹⁸ A6917 SIGMA® - Sigma-Aldrich Brasil Ltda. São Paulo, São Paulo.

¹⁹ Multiskan EX – Labsystems - Thermo Fisher Scientific Inc.

Posteriormente foi multiplicado os valores obtidos pelo fator de diluição de cada amostra. Foram admitidas as reações com curvas que apresentaram coeficiente de variação (CV) <10% nas duplicatas e com $R^2 > 0,95$. Todas as amostras foram testadas em triplicatas e consideradas as que tiveram CV <10%, as que apresentaram concentrações superiores a curva padrão foram diluídas e multiplicadas pelo fator de diluição correspondente.

4.6.4.1 Teste de repetibilidade S-ELISA

Foi avaliado a repetibilidade intra e inter-teste, dos resultados do sistema S-ELISA, tanto do IgG equino purificado (utilizado como padrão) quanto das amostras de soro e colostro testadas. Para tal, foi avaliado o coeficiente de variação (CV) das DO's das amostras teste e padrão de referência, em duplicatas, dentro de uma mesma microplaca (intra-teste) e o CV das DO's das mesmas amostras em diferentes microplacas (inter-teste) (OIE, 2014).

Foram realizadas cinco diluições seriadas do IgG equino padrão (de 01 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ até 0,015 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e distribuídas, em duplicatas, em cinco pontos diferentes de uma mesma microplaca. A mesma diluição seriada foi avaliada em cinco microplacas diferentes, sendo que cada teste foi realizado em diferentes dias. Também foram escolhidas, aleatoriamente, dez amostras teste (cinco de soro e cinco de colostro) e testadas, em duplicata, em diluições ótimas, em quatro pontos distintos de uma mesma microplaca, o procedimento foi realizado três vezes em diferentes dias.

Para verificar a exatidão do teste incluiu-se uma amostra com concentração conhecida como controle positivo²⁰. Todas as diluições, tanto do IgG padrão quanto das amostras teste foram realizadas de forma independente para cada ponto da microplaca.

4. 7 Análise do Colostro

O colostro das éguas PSI foi avaliado imediatamente após o parto, antes dos potros mamarem, com auxílio de um colostrômetro de refração BRIX²¹ (CASH, 1999). Em laboratório foi utilizado um colostrômetro de densidade

²⁰ Equine IgG Antibody - VMRD INC, Pullman - WA

²¹ ARS Equine Colostrum Refractometer. Animal Reproduction Systems, Inc. Califórnia, USA.

específica²² sugerido por Leblanc e colaboradores (1986) para analisar as amostras de colostro congeladas. Ambos os testes foram realizados de acordo com as normas dos respectivos fabricantes.

Também foi avaliado a concentração de IgG total do colostro por ensaio Imunoenzimático e imunodifusão radial simples.

4.8 Análise estatística

Foi realizada estatística descritiva (média, desvio padrão) dos dados clínicos e etológicos dos potros e éguas. Todas as variáveis quantitativas foram testadas quanto à normalidade e homocedasticidade dos dados.

Um modelo linear misto (PROC MIXED - SAS[®] University Edition) foi utilizado para comparar a diferença dos valores de PT e IgG do grupo de potros obtidos por diferentes testes nos cinco momentos. Demais variáveis quantitativas nos cinco momentos do grupo de potros foram submetidas a ANOVA de medidas repetidas e Tukey como teste a posteriori. Para comparação dos valores médios das variáveis quantitativas entre potros e éguas foi utilizado ANOVA-One Way e teste de múltiplas comparações de Tukey.

Para variável não paramétrica a comparação de medianas dependentes e independentes foram utilizados os testes de Friedman e Kruskal Wallis, respectivamente, seguidos do teste de múltiplas comparações de Dunn.

Foi utilizado coeficiente de correlação de Pearson para as seguintes correlações: Entre concentrações obtidas por diferentes métodos para PT do grupo de potros nos cinco momentos; entre concentrações de PT (ambos os métodos), gamaglobulina, globulina total e concentração de IgG total (ambos os métodos); entre concentração de IgG sérico e colostrar das éguas; entre densidade (dois métodos) e concentração de IgG colostrar; concentração de IgG e proteínas séricas dos potros; entre as concentrações de IgG total (todas as amostras) estimadas por S-ELISA e IDRS.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares computacionais SAS[®] University Edition e GraphPad Prism[®] 5.01 e consideradas significativas quando $P < 0,05$.

²² JorVet Equine Colostrometer. Jorgensen Laboratories Inc. Colorado, USA.

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínicos dos potros e éguas

Do total de potros avaliados, 12 eram machos (60%) e 8 fêmeas (40%), o peso e altura média ao nascer foi de $51,24 \pm 7,31$ kg e $99,75 \pm 5,06$ cm, respectivamente. As médias das variáveis fisiológicas do grupo de potros (imediatamente após o parto), Score APGAR e dados referentes as placentas avaliadas estão descritas na Tabela 1.

A mediana (mínimo/máximo) para frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal do grupo de potros, nos cinco momentos, estão descritos na Tabela 2. A frequência cardíaca dos potros não diferiu estatisticamente de M1 até M4, diminuindo estatisticamente em M5. A frequência respiratória se manteve acima dos 60 movimentos por minuto até M4, diminuindo significativamente em M5 quando comparado com M3. Já a temperatura retal teve aumento significativo de M1 a M2, não diferindo nos demais momentos quando comparado a M2.

O tempo médio de gestação das éguas foi de $330 \pm 11,05$ dias e variou de 316 a 355 dias. Já a idade e número de partos foram de $13,65 \pm 5,05$ (8 a 24 anos) e $4,45 \pm 3,17$ (1 a 12 partos), respectivamente. Apenas um dos partos ocorreu com a égua em estação, todos os demais ocorreram com as éguas em decúbito lateral e o tempo médio \pm desvio padrão (mínimo/máximo) foi de 8 ± 7 (2/30) minutos.

TABELA 1 - Média \pm desvio padrão (DP) das variáveis etológicas e score APGAR de potros da raça puro sangue inglês e dados da placenta de suas respectivas mães logo após o nascimento (n=20).

Variável	Média \pm DP	Min	Máx.
Tempo decúbito external (minutos)	$3,5 \pm 1,73$	1	7
Tempo levantar (minutos)	41 ± 20	10	90
Tempo para 1º mamada (minutos)	$74,1 \pm 26,4$	25	120
Tempo eliminar mecônio (minutos)	$36,5 \pm 19,21$	15	85
Score APGAR	$7,2 \pm 1,05$	5	8
Peso placenta (kg)	$6,39 \pm 1,37$	4	8,9
Comprimento cordão umbilical (cm)	$58,3 \pm 14,7$	35	90
Nº torções cordão umbilical	$5,35 \pm 2,32$	1	9
Tempo para dequitação (minutos)	57 ± 56	8	245

TABELA 2 - Mediana (mínimo/máximo) das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) e temperatura retal (TR) de potros da raça puro sangue inglês, em cinco momentos, do nascimento aos 30 dias de vida (n=20).

Momento	FC (bpm)	FR (mpm)	TR °C
M1	88 (60/116) ^a	62 (40/80) ^a	37,8 (37,4/38,5) ^a
M2	100 (84/108) ^a	72 (40/80) ^a	38,5 (38/38,9) ^b
M3	100 (84/112) ^a	68 (44/80) ^a	38,5 (38,2/39,3) ^b
M4	101 (84/106) ^a	64 (36/80) ^{ab}	38,5 (38/39) ^b
M5	80 (64/100) ^b	48 (36/80) ^b	38,3 (37,8/39) ^b

- Medidas seguidas por letras sobrescritas iguais nas colunas não diferem entre si ($P > 0,05$)

- M1= logo após o parto, previamente mamar colostro; M2= dez horas de vida; M3= 24-36 horas de vida, previamente transfusão plasma hiperimune; M4= 24 horas após administração do plasma hiperimune; M5= 30 dias de vida; bpm = batimentos por minuto; mpm = movimentos por minuto.

5.2 Proteína Total, Albumina e Globulinas Totais

Na análise de variância utilizando o modelo linear misto, onde o tipo de teste para PT foi considerado efeito fixo, não foi observado diferença estatística entre os valores de PT sérica dos potros em nenhum dos momentos ($P > 0,05$). Houve forte correlação ($r=0,92$ e $P < 0,0001$) entre os resultados obtidos nas duas técnicas de avaliação da PT sérica dos potros (nos cinco momentos) (Figura 1).

A concentração de PT e GT dos potros foram significativamente correlacionadas nos cinco momentos ($r=0,94$ e $P < 0,0001$). As médias \pm desvios padrão da PT (ambos os métodos de análise), albumina e globulina total estão dispostos na Tabela 3.

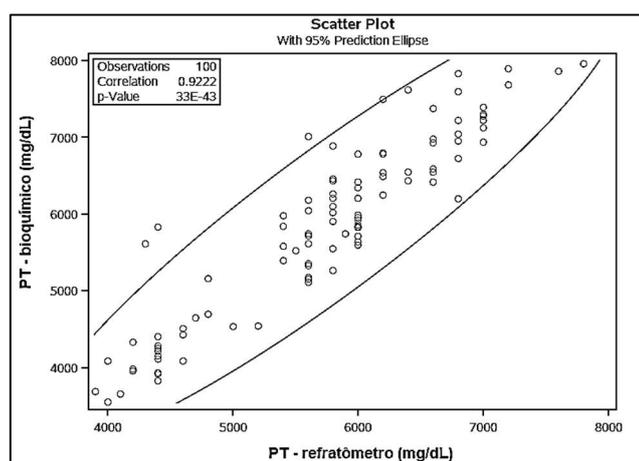


FIGURA 1 - Representação gráfica da forte correlação positiva entre os valores de PT obtidos através de refratômetro manual e analisador bioquímico com coeficiente de correlação de Pearson 0,92 e $P < 0,0001$.

TABELA 3 - Média \pm desvio padrão da Proteína Total (dois métodos), Albumina e Globulinas Totais dos potros (n=20), nos cinco momentos, e éguas (n=20) no momento do parto.

Proteínas (mg/dL)	Momentos					Éguas	
	M1	M2	M3	M4	M5		
PT (refratômetro)	\bar{X}	4.350 ^{ab}	6.080 ^{bc_B}	5.890 ^{b_B}	6.370 ^{c_B}	5.970 ^{b_B}	7.140 ^A
	\pm	252	839	771	585	343	535
PT (bioquímico)	\bar{X}	4.095 ^{a_B}	6.340 ^{b_B}	6.095 ^{b_B}	6.799 ^{c_A}	5.959 ^{a_B}	7.326 ^A
	\pm	283	961	823	712	470	588
Albumina (bioquímico)	\bar{X}	2.950 ^{a_B}	2.767 ^{b_B}	2.712 ^{b_B}	2.735 ^{b_B}	2.867 ^{ab_B}	3.555 ^A
	\pm	268	253	282	314	193	251
Globulina total	\bar{X}	1.874 ^{a_B}	3.493 ^{b_A}	3.672 ^{b_A}	3.669 ^{b_A}	3.092 ^{b_A}	3.772 ^A
	\pm	1.251	1.011	944	717	427	566

M1= logo após o parto, previamente mamar colostro; M2= dez horas de vida; M3= 24 horas de vida, previamente transfusão plasma hiperimune; M4= 48 horas de vida; M5= 30 dias de vida. Médias com letras iguais nas linhas demonstram semelhança estatística entre as médias ($P \leq 0,05$).

5.3 Proteinograma (Eletroforese em gel de agarose)

A Figura 2 demonstra o resultado da leitura, das amostras de soro de um potro no M1 e M2 submetida a eletroforese em gel de agarose, onde é possível verificar a virtual ausência da fração gamaglobulina, pois o potro ainda não havia mamado o colostro.

As medidas de tendência central e dispersão das concentrações séricas de PT e frações proteicas do grupo de potros (nos cinco momentos) e suas progenitoras (imediatamente após o parto) estão descritos na Tabela 4.

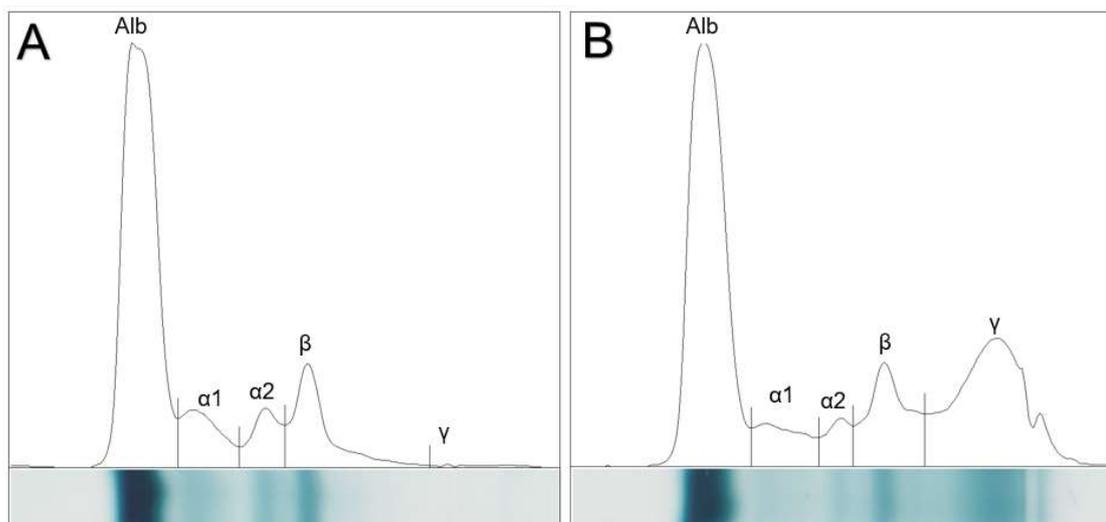


FIGURA 2 - Configuração do laudo de leitura das frações proteicas séricas de um potro clinicamente saudável no M1 (A) e M2 (B). Os picos representam, da esquerda para a direita, as bandas albumina, α_1 , α_2 , β e γ -globulinas no gel de agarose. Notar a fração gamaglobulina virtualmente inexistente em M1 (A) onde o potro ainda não havia mamado o colostro.

A PT dos potros aumentou de forma significativa de M1 a M2 e de M3 para M4, diminuindo estatisticamente ao M5 em comparação ao M4. Quando comparado as éguas no momento do parto, somente os valores de M4 estavam em níveis semelhantes.

O valor médio de albumina, obtido por eletroforese, dos potros aumentou de forma significativa do M1 até M2, no M3 estava em concentração semelhante a M2 e aumentou significativamente de M3 a M4. No M5 a concentração de albumina não diferiu estatisticamente de M1. Em todos os cinco momentos a albumina sérica dos potros estavam menores do que a albumina sérica das éguas no momento do parto.

TABELA 4 - Medidas de tendência central e dispersão da proteína total (PT) obtida através de analisador bioquímico e das frações proteicas - Alb. (albumina), α 1 (alfa1-globulina), α 2 (alfa2-globulina), β (beta-globulina) e γ (gamaglobulina) - dos potros (n=20) nos cinco momentos e éguas progenitoras (n=20) no momento do parto.

Proteínas (mg/dL)	Potros (n=20)					Éguas (n=20)	
	M1	M2	M3	M4	M5		
PT	\bar{X}	4.095 ^{aB}	6.340 ^{bB}	6.095 ^{bB}	6.799 ^{cA}	5.959 ^{aB}	7.326 ^A
	\pm	283	961	823	712	470	588
Alb.	\bar{X}	2.617 ^{aB}	2.925 ^{bcB}	2.799 ^{bB}	3006 ^{cB}	2.589 ^{aB}	3.659 ^A
	\pm	358	332	377	267	241	335
α 1	\bar{X}	377 ^{aA}	400 ^{abA}	391 ^{aA}	454 ^{bA}	586 ^{cB}	411 ^A
	\pm	82	104	78	116	118	98
α 2	\bar{X}	368 ^{aA}	371 ^{aA}	338 ^{aA}	367 ^{aA}	456 ^{bA}	421 ^A
	\pm	79	98	132	89	64	70
β *	Mediana	660 ^{aB}	780 ^{bB}	775 ^{abB}	1.055 ^{cdA}	1.325 ^{dA}	1.215 ^A
	Min/Max	250/750	550/1.390	490/1.000	720/1.290	920/1.720	850/1.900
γ	\bar{X}	84 ^{aB}	1.816 ^{bA}	1.805 ^{bA}	1.911 ^{bA}	991 ^{cB}	1.580 ^A
	\pm	59	572	463	451	330	330

- * Variável considerada não paramétrica - valores de tendência central representados por mediana e de dispersão representados por mínimo e máximo.

- M1= logo após o parto, previamente mamar colostro; M2= dez horas de vida; M3= 24-36 horas de vida, previamente transfusão plasma hiperimune; M4= 24 horas após administração do plasma hiperimune; M5= 30 dias de vida.

- Letras sobrescritas minúsculas iguais indicam médias semelhantes ($P < 0,05$) entre os cinco momentos do grupo de potros e subscritas maiúsculas iguais indicam médias semelhantes ($P < 0,05$) entre grupo de éguas com cada um dos momentos dos potros.

A fração α 1-globulina se manteve em níveis semelhantes de M1 até M3 e aumentou de forma significativa de M3 para M4 e M5. Quando comparada a fração α 1-globulina sérica dos potros com a α 1-globulina sérica das éguas no momento do parto, observamos que de M1 a M4 estava menor e em M5 os valores dos potros foram significativamente maiores que das suas respectivas mães.

Já a fração α 2-globulina se manteve em níveis constantes do M1 até M4 e aumentadas de forma significativa no M5 quando comparado aos demais momentos. Em nenhum dos cinco momentos esta fração proteica diferiu estatisticamente dos níveis sérico das éguas no momento do parto.

A fração β -globulina aumentou de forma significativa de M1 a M2, se manteve em níveis semelhantes de M2 a M3, aumentou significativamente de M3 para M4 e M5 quando comparado a M4. Quando comparado com os valores das éguas foram observados valores menores de M1 até M3 e valores semelhantes em M4 e M5.

A concentração sérica da fração γ -globulina aumentou de forma significativa de M1 para M2. Observou-se níveis semelhantes de M2 até M4 e concentração significativamente menor em M5 quando comparado a M4. Em comparação aos valores séricos de γ -globulina das éguas, os valores dos potros no M2, M3 e M4 eram semelhantes e no M5 estavam significativamente menores. As concentrações séricas de PT (ambos métodos) e γ -globulinas dos potros no M2 foram significativamente correlacionadas ($P < 0,001$) (Figura 3).

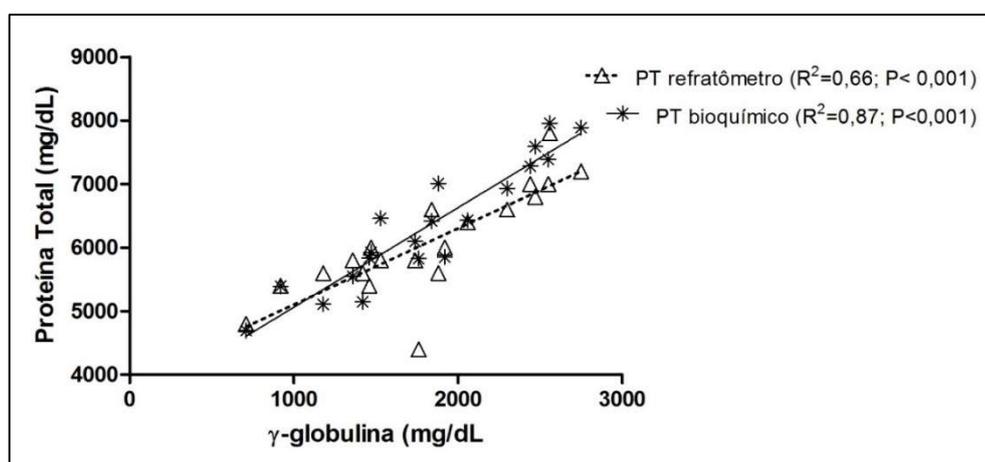


FIGURA 3 - Representação gráfica da relação entre concentração sérica de proteína total (PT), obtidas pelas técnicas de refração e biureto em analisador bioquímico, e a fração γ -globulina pela técnica de eletroforese em gel de agarose dos potros com 10 horas de vida ($P < 0,0001$).

5.4 Determinação IgG total

5.4.1 Anticorpos purificados

A pureza da IgG equina e anticorpo de coelho anti-IgG equino ficou evidenciada na eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% pela identificação das cadeias leve e pesadas (25 e 50 KDa, respectivamente) de ambos os anticorpos (Figura 4). Para a determinação da concentração proteica destes anticorpos, pela técnica de BCA, foi utilizado uma curva padrão

demonstrada na Figura 5, com base em concentrações conhecidas de IgG humana.

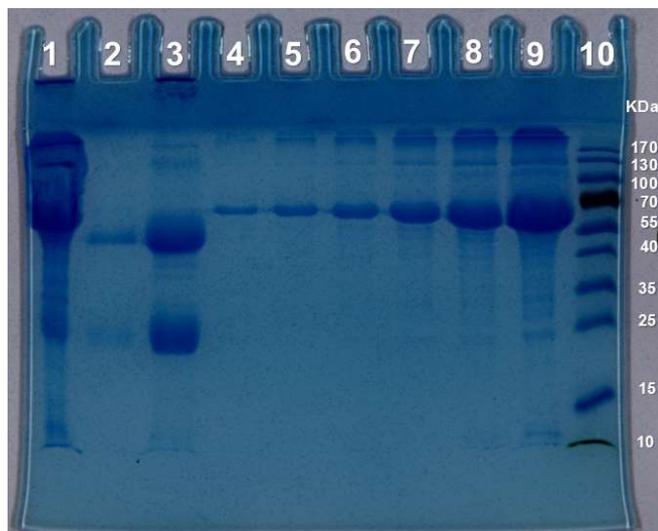


FIGURA 4 - Eletroforese SDS-PAGE 12,5%: Caracterização de imunoglobulina G a partir da identificação de suas cadeias leve e pesada, 25 KDa e 50 KDa respectivamente. Colunas 2 e 3 - amostras IgG equina e IgG de coelho anti-equina, respectivamente; colunas 4 a 9 – soro albumina bovina; Coluna 10 - padrão de peso molecular.

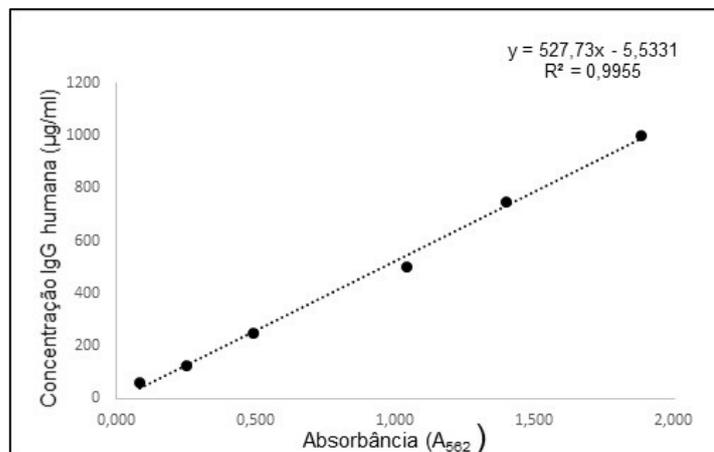


FIGURA 5 - Correlação entre concentrações de IgG humana (1 µg/ml; 0,75 µg/ml; 0,5µg/ml; 0,25µg/ml; 0,125µg/ml; 0,062µg/ml) e seus respectivos valores de absorvância, obtidos pela técnica de BCA, utilizados para análise de regressão linear e construção da equação da reta padrão, para determinação das concentrações relativas de IgG equina e IgG de coelho anti-IgG equino.

5.4.2 Teste de repetibilidade do S-ELISA

No teste de repetibilidade do sistema de S-ELISA foram observados CV<9,5% e CV<11,6% para o intra e inter-teste das curvas padrão,

respectivamente, com limites de detecção de 62ng/ml a 1.000ng/ml. Já o CV intra e inter-teste das amostras avaliadas foram $CV < 9,7\%$ e $CV < 15,7\%$, respectivamente. A concentração média estimada para amostra controle (800mg/dL) em seis corridas diferentes foi de 796 ± 181 mg/dL o que corresponde a uma precisão de 96%.

5.4.3 Determinação IgG total por IDRS e S-ELISA

As concentrações séricas de IgG determinadas pela IDRS, em todas as amostras (soro, colostro e plasma) foram estatisticamente maiores ($P < 0,001$) do que pela técnica de S-ELISA. No entanto, ambos resultados apresentaram forte correlação (Figura 6). Estão dispostos na tabela 5 as médias e desvios padrão das concentrações de IgG séricas de potros e éguas. A média e desvio padrão da concentração de IgG total das amostras de plasma (utilizado nos potros em M3), obtidas por S-ELISA e IDRS, foi de 2.026 ± 148 mg/dL e 4.185 ± 1125 mg/dL, respectivamente.

Na Figura 7 estão ilustradas as diferenças das concentrações de IgG dos potros, do nascimento aos trinta dias de vida, quando avaliados por S-ELISA e IDRS. A Figura 8 ilustra as diferenças entre concentrações de IgG séricas e colostrais das éguas progenitoras obtidas por ambas as técnicas.

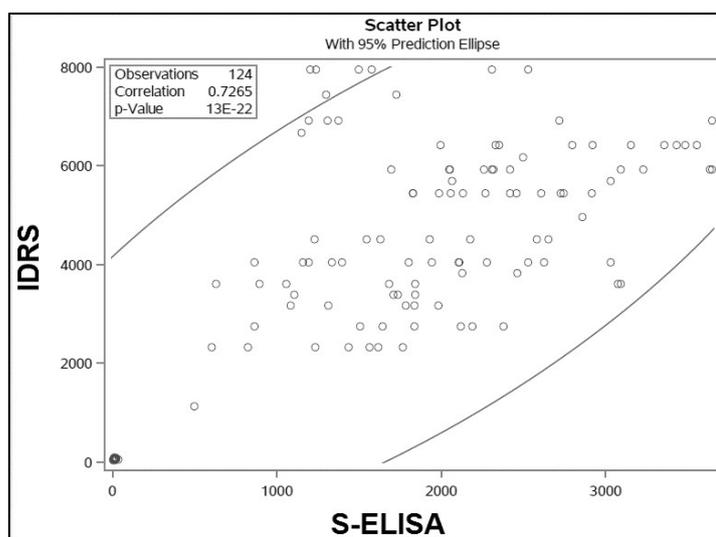


FIGURA 6 - Representação gráfica da relação positiva entre as concentrações de IgG nas amostras de soro e plasma avaliadas por S-ELISA e IDRS ($r=0,72$ e $P < 0,0001$).

TABELA 5 - Média \pm desvio padrão das concentrações de IgG sérico de potros em cinco momentos, suas respectivas mães e do plasma no momento da transfusão, obtidos através da técnica de S-ELISA e IDRS.

Grupo	Amostra	Momentos	IgG (mg/dL) *	
			S-ELISA	IDRS
Potro	Soro	M1	15 \pm 8 ^a	56 \pm 17 ^a
Potro	Soro	M2	2.408 \pm 628 ^b	5.231 \pm 1.341 ^b
Potro	Soro	M3	2.282 \pm 783 ^{bd}	5.374 \pm 1.125 ^b
Potro	Soro	M4	2.364 \pm 784 ^b	5.861 \pm 942 ^b
Potro	Soro	M5	1.414 \pm 586 ^c	3.035 \pm 902 ^c
Égua	Soro	Parto	1.746 \pm 505 ^{cd}	4.871 \pm 2.116 ^b

* Diferença estatística entre os testes de S-ELISA e IDRS em todas as amostras ($P < 0,001$).

^{a-e} Amostras com médias iguais não se diferem estatisticamente dentro de cada tipo de teste ($P < 0,05$).

M1= logo após o parto, previamente mamar colostro; M2= dez horas de vida; M3= 24 horas de vida (previamente transfusão plasma); M4= 48 horas de vida (24 horas após transfusão plasma); M5= 30 dias de vida.

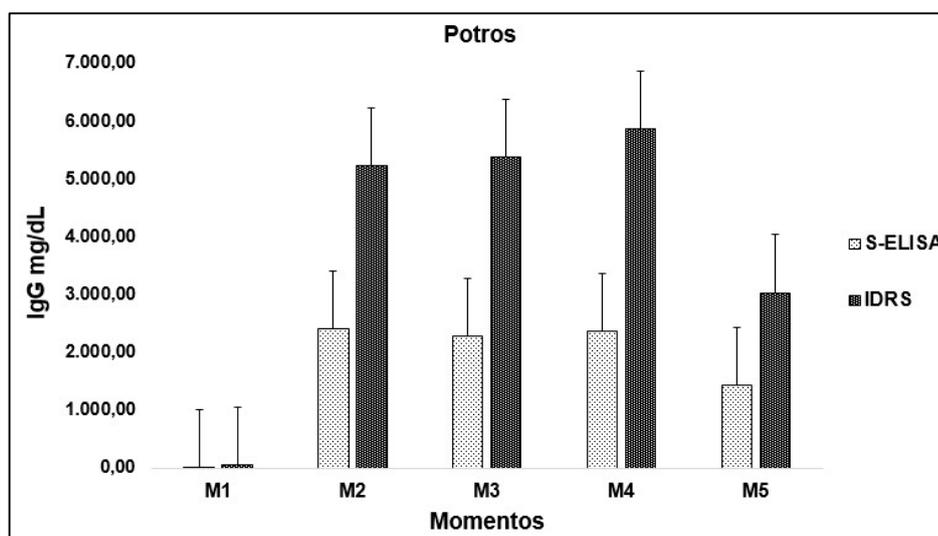


FIGURA 7 - Histograma mostrando a diferença dos valores de IgG sérico dos potros entre os momentos de avaliação obtidos através de S-ELISA e IDRS. M1= logo após o parto, previamente mamar colostro; M2= dez horas de vida; M3= 24 horas de vida (previamente transfusão plasma); M4= 48 horas de vida (24 horas após transfusão plasma); M5= 30 dias de vida.

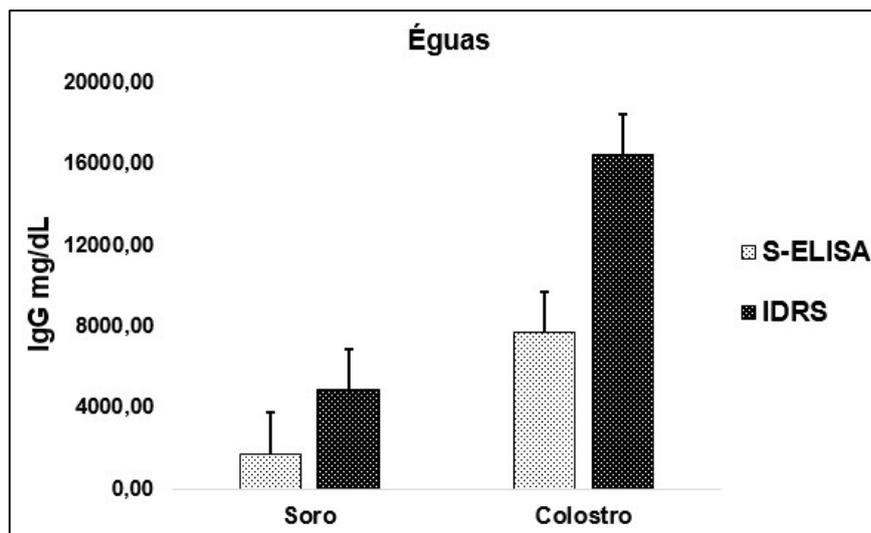


FIGURA 8 - Histograma mostrando a diferença entre os valores de IgG sérico e colostrado, das éguas progenitoras, obtidos através de S-ELISA e IDRS.

Em ambos os testes os níveis séricos de IgG aumentaram significativamente de M1 a M2 ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparados os níveis de IgG sérico dos potros em M2, M3 e M4, diminuindo significativamente em M5. Nos resultados obtidos pelo S-ELISA em M2 e M4 os potros apresentavam níveis séricos de IgG maiores ($P < 0,01$) que o das éguas progenitoras no momento do parto e nos resultados obtidos por IDRS não houve esta diferença ($P > 0,05$).

Foi observada moderada correlação positiva entre os valores de PT estimado por refratômetro e IgG pelas técnicas de IDRS e S-ELISA ($r = 0,67$ e $r = 0,68$, respectivamente) e fraca correlação positiva entre concentração de PT estimada pela técnica de Biureto e IgG por ambas as técnicas ($r = 0,44$ e $r = 0,27$, respectivamente) (Figura 9).

Houve fraca correlação positiva entre os valores de GT e IgG total (por ambas as técnicas) dos potros nos cinco momentos (Figura 10) e forte correlação dos valores de γ -gama globulina e IgG, nos cinco momentos, (Figura 11).

Quando correlacionados os valores séricos de IgG dos potros no M2 com a concentração de IgG colostrado, por S-ELISA, das éguas no momento do parto foi observado fraca correlação positiva ($r = 0,46$ e $p < 0,05$). Não houve correlação entre a concentração de IgG sérico dos potros em M2 e IgG colostrado determinado por IDRS (Figura 12).

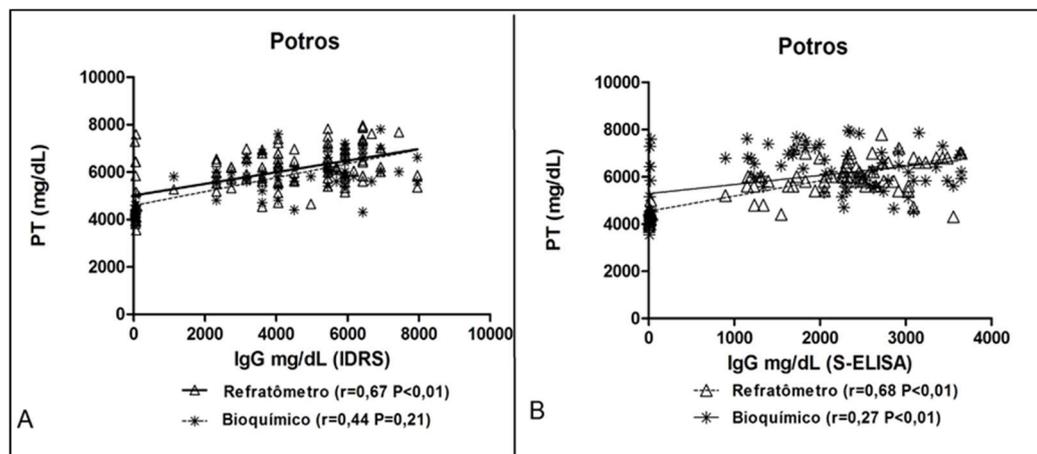


FIGURA 9 - Representação gráfica da relação entre concentração sérica de proteína total (PT), obtidas em analisador bioquímico e refratômetro, e IgG sérico pela técnica de IDRS (A) e S-ELISA (B) nos cinco momentos ($P < 0,01$).

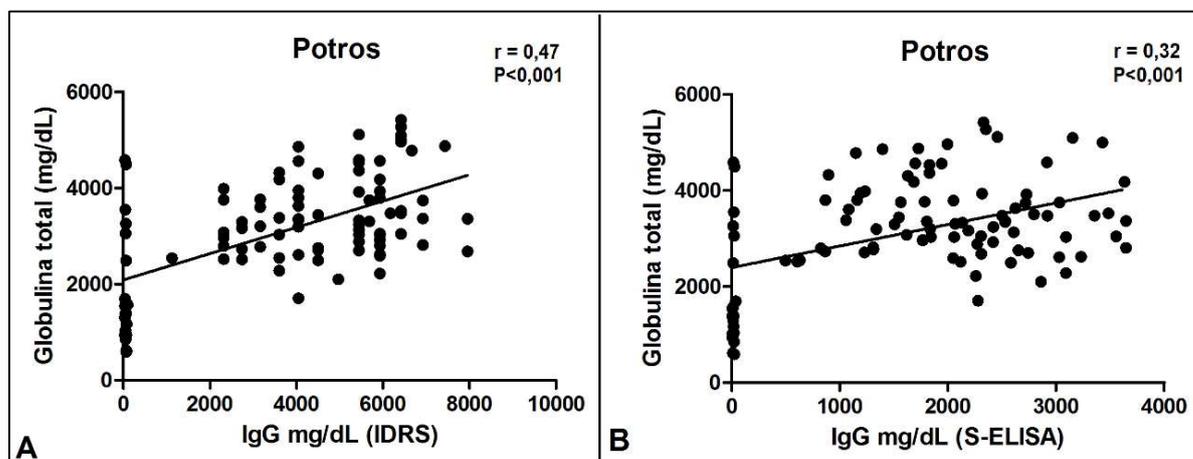


FIGURA 10 - Representação gráfica da correlação entre concentração de globulina total e IgG sérico pela técnica de IDRS (A) e S-ELISA (B) nos cinco momentos de avaliação dos potros.

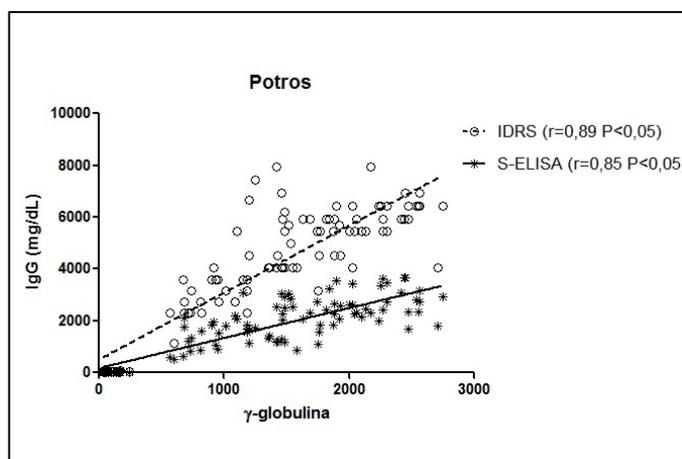


FIGURA 11 - Representação gráfica da correlação entre concentração da fração γ -globulina e IgG sérico pela técnica de IDRS e S-ELISA nos cinco momentos de avaliação dos potros.

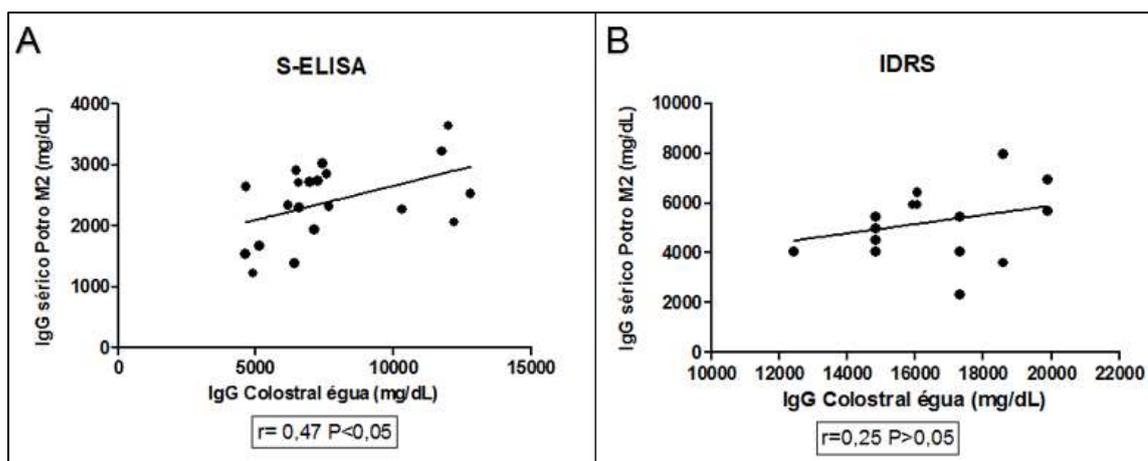


FIGURA 12 - Representação gráfica da correlação entre concentração de IgG sérico dos potros no M2 e colostrado das éguas no momento do parto pela técnica de S-ELISA (A) e IDRS (B).

5.5 Densidade e concentração de IgG colostrado

A média e desvio padrão da densidade específica, índice BRIX e concentração de IgG colostrado determinada por S-ELISA e IDRS estão dispostos na Tabela 6.

Foi encontrada fraca correlação positiva entre os resultados obtidos por meio dos dois tipos de colostrômetro (Figura 13). Não foi observada correlação entre a densidade colostrado (ambos os testes) e níveis séricos de PT, GT e gamaglobulinas das éguas PSI.

Houve moderada correlação entre concentração de IgG por IDRS e densidade específica das amostras de colostro, fraca correlação entre a densidade (ambos os métodos) e concentração de IgG colostrado avaliada por S-ELISA e não houve correlação entre densidade específica e concentração de IgG colostrado avaliada por IDRS (Figura 14).

TABELA 6 - Média \pm Desvio Padrão da densidade específica, índice BRIX e concentração de IgG, estimado por S-ELISA e IDRS, de amostras de colostro de éguas colhidas imediatamente após o parto, antes da primeira mamada dos potros (n=20).

	Densidade específica	Índice BRIX %	IgG (mg/dL) ¹	
			S-ELISA	IDRS
\bar{X}	1.080	28,05	7.714	16.447
\pm	0.017	2,72	2.619	1.869

¹ Diferença estatística entre os testes de ELISA e IDRS ($P < 0,0001$)

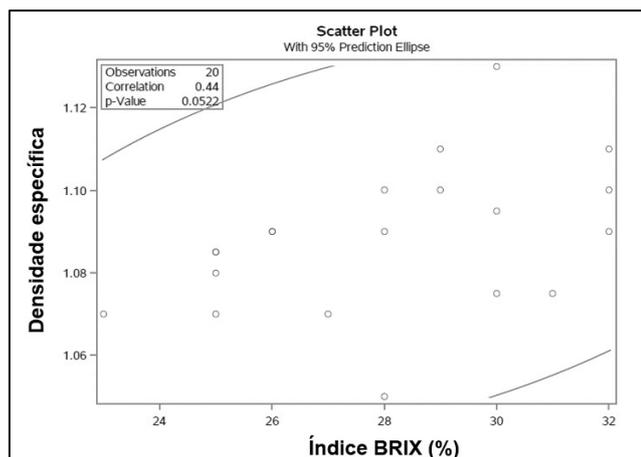


FIGURA 13 - Representação gráfica da correlação positiva entre a densidade das amostras de colostro avaliado colostrômetro portátil de índice BRIX e colostrômetro de densidade específica ($r=0,44$ e $P=0,05$).

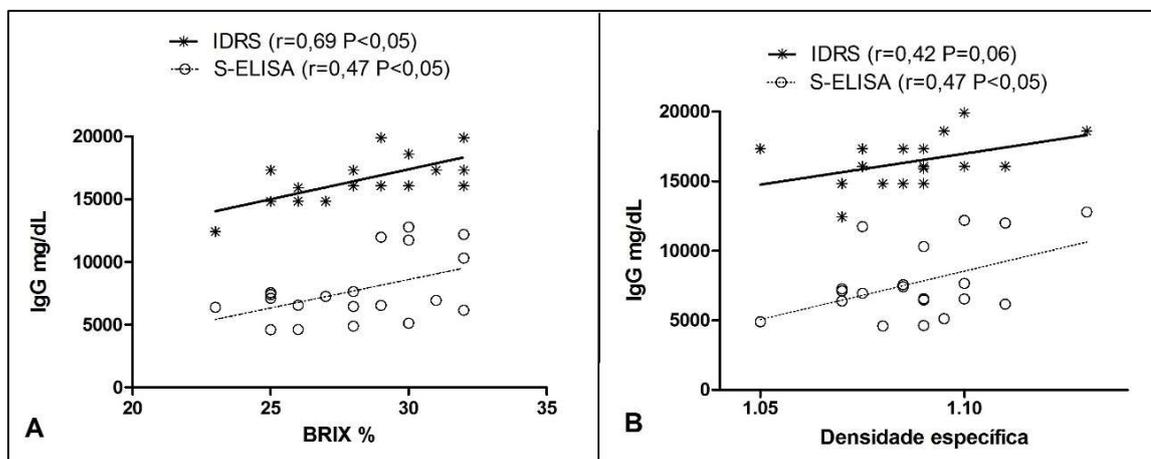


FIGURA 14 - Representação gráfica da relação entre densidade, avaliado por colostrômetro de índice BRIX (A) e densidade específica (B) e concentração de IgG avaliado por S-ELISA e IDRS, das amostras de colostro.

6 DISCUSSÃO

Nenhum dos potros incluídos neste estudo apresentaram sinais clínicos compatíveis com afecções inflamatórias ou infecciosas durante o período de estudo. A única alteração observada ao nascimento foram desvios angulares e/ou flexurais, mas nenhum dos potros incluídos no estudo teve a ingestão do colostro prejudicada devido à dificuldade de manter-se em estação para mamar (JEFFCOTT, 1974).

A média dos valores para o peso, altura, tempo para levantar e tempo para mamar dos potros estavam de acordo com dados etológicos para indivíduos da mesma raça e com padrão de manejo semelhante aos animais deste estudo (KURTZ FILHO et al., 1997), exceto no tempo para eliminar o mecônio, que nos potros aqui observados foi menor. Todos os potros receberam laxativo profilático por via retal (enema) logo após o nascimento, antes de mamar o colostro pela primeira vez. A retenção de mecônio é a causa mais comum de cólica em potros neonatos (RYAN; SANCHEZ, 2005), foi considerada a terceira causa mais frequente de problemas em potros (4%) no Canadá (MORLEY; TOWNSEND, 1997) e por isso é uma prática adotada em várias propriedades de criação de cavalos puro sangue de corrida (KNOTTENBELT et al., 2003b; WILLIAMSON et al., 2007) apesar do risco de hiperfosfatemia em neonatos (HICKMAN et al., 2004; BIEBL et al., 2009), o que não ocorreu em nenhum dos potros aqui observados.

O score APGAR médio dos potros estava de acordo o intervalo considerado como satisfatório para neonatos nos primeiros cinco minutos de vida (KNOTTENBELT et al., 2003b; LU et al., 2006; PARADIS, 2006). Três (dos 20 potros) apresentaram score APGAR cinco, todos os demais apresentaram score sete ou oito, porém, em nenhum dos casos foi necessário realizar procedimentos de reanimação.

Os parâmetros vitais dos potros (frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal) em todos os momentos de avaliação se mantiveram dentro da variação normal. É considerado como ideal tempo de gestação de, pelo menos, 320 dias de gestação para completa maturação fetal (PARADIS, 2006). Dois dos potros inclusos nesta pesquisa nasceram com menos de 320 dias de gestação, mas nenhum apresentou sinais clínicos de mal ajustamento ou tiveram FTIP.

Os níveis séricos da proteína total das éguas no momento do parto e dos animais doadores não diferiram estatisticamente, estando de acordo com os valores de referência relatados pela literatura (KANEKO et al., 2008; RIOND et al., 2009b). A concentração de PT dos potros apesar de estar diminuída aos trinta dias de vida, quando comparado às primeiras 24-48 horas (M3-M4), ainda estavam dentro dos valores de referência e estatisticamente semelhantes aos valores dos animais adultos. Esta diminuição sérica da PT dos potros pode ser normal, uma vez que neste período (3-4 semanas de vida) a proteína oriunda do leite da égua esteja em menor quantidade e o potro está começando a se adaptar à alimentação sólida (FRAPE, 2004).

A fração albumina dos potros ao nascimento correspondeu a mais de 50% da PT, estava dentro dos valores considerados como normal (KANEKO et al., 2008). Todavia, estava acima dos valores encontrados na literatura, em potros com menos de uma semana de vida atendidos em unidade hospitalar (WONG et al., 2013), o que pode ser atribuída ao fato da albumina ser considerada uma proteína de fase aguda negativa e pode diminuir rapidamente frente a processos infecciosos ou inflamatórios (KANEKO et al., 2008), e neste trabalho todos os potros estavam hígidos.

Já foi observado que as frações α e β -globulinas são compostas por proteínas de fase aguda, e se elevam rapidamente em situações inflamatórias ou infecciosas (KANEKO et al., 2008; FAVERO et al., 2011). Equinos com problemas infecciosos (doenças gastrointestinais) e inflamatórios (problemas locomotores) possuem níveis séricos maiores das subfrações α_1 e β -globulinas quando comparados a grupo de animais hígidos (VICTORIA CARAPETO et al., 2006). No presente estudo foi observado que as frações α -globulinas permaneceram em níveis constantes de M1 a M4 (nascimento até 24-48 horas de vida), sendo que a fração α_1 aumentou de forma significativa de M3 a M4, ou seja, 24 horas após administração do plasma.

A fração β -globulina aumentou de forma significativa de M1 a M2 ($P < 0,05$), e teve um aumento bastante significativo ($P < 0,0001$) de M3 a M4 (após os potros receberem o plasma) e no M5 quando comparado ao M3 ($P < 0,0001$). As frações alfa e beta globulinas detectadas através de eletroforese compreendem uma séria de proteínas de fase aguda (proteína C reativa, hemopexina, transferrina, fibrinogênio e amiloide A) que aumentam rapidamente

frente processos inflamatórios diversos (MURATA et al., 2004; KANEKO et al., 2008), podendo algumas serem secretadas no colostro e leite de éguas (MCDONALD et al., 2001; DUGGAN et al., 2008). O perfil eletroforético de proteínas de fase aguda são utilizados para diagnóstico de sepse em potros, sabe-se que em potros septicêmicos ocorre uma diminuição significativa de Amiloide A em processos agudos, aumentando com a cronicidade da doença (PALTRINIERI et al., 2008; JACOBSEN; ANDERSEN, 2010).

A fração gamaglobulina é composta pelas imunoglobulinas IgA, IgM, IgE e IgG (KANEKO, 2008), sendo esta última a imunoglobulina mais abundante (TIZARD, 2004). Estão em quantidades muito pequenas nos potros ao nascer, aumentando nas primeiras horas de vida após ingerir colostro até atingir o pico de absorção entre 18 e 24 horas (JEFFCOTT, 1974). No presente estudo a fração γ -globulina estava abaixo de 100mg/dL ao nascimento aumentando significativamente ($P < 0,0001$) com 10 horas de vida, sugerindo que o pico de absorção de imunoglobulinas, contidas na fração gama, pode ocorrer até as dez horas de vida, mais cedo do que os resultados observados em trabalhos anteriores (JEFFCOTT, 1974; ERHARD et al., 2001; LANG et al., 2007).

Aos trinta dias a concentração sérica de γ -globulina diminuiu significativamente ($P < 0,05$) devido o tempo de meia vida das principais imunoglobulinas ser de aproximadamente 30 dias (SHEORAN et al., 2000). Todavia, em M5 as concentração média da fração gamaglobulina dos potros ainda estava em níveis considerados como suficientes para promover proteção contra agentes infecciosos (JEFFCOTT, 1974; KOHN et al., 1989).

A correlação positiva entre as concentrações séricas de proteína total determinada por ambos os métodos ($r^2=0,66$ por refratometria e $r^2=0,87$ por bioquímico) e fração γ -globulina dos potros com 10 horas de vida (M2) sugere que a aferição da PT pode ser utilizada para estimar a concentração de gamaglobulinas e identificar possíveis casos de FTIP na propriedade, pois refratômetros manuais são de simples operação e baixo custo. Tais observações corroboram com resultados relatados por korosue e colaboradores (2012), onde afirmam que a diferença da concentração da proteína total antes e após potros mamarem colostro pode ser utilizado como teste de triagem para FTIP.

Além da proteína total e albumina as frações proteicas que diferiram estatisticamente antes e após a administração do plasma foram α_1 e β -

globulinas. Todavia, não podemos evidenciar cientificamente tal fato e atribuir esta diferença ao tratamento com plasma, uma vez que não foi possível utilizar um grupo controle por questões intrínsecas ao manejo da propriedade, pois o risco aos animais não justificaria esta utilização.

A concentração média de IgG séricos dos potros (em todos os momentos), bem como séricos e colostrais das éguas determinados por IDRS neste estudo foram maiores do que os observados em outros estudos (LEBLANC et al., 1986; KOHN et al., 1989; MCCLURE et al., 2001; RAIDAL et al., 2005; LANG et al., 2007). Todavia, em nenhum destes trabalhos os autores relataram se as éguas progenitoras foram submetidas à algum tipo de protocolo vacinal na fase final de gestação, isto pode influenciar de forma significativa na concentração de imunoglobulinas séricas e colostrais das éguas e conseqüentemente na concentração sérica dos potros (CAUCHARD et al., 2004; MARTINS et al., 2010). Já foi evidenciado que potros hígidos nascidos de éguas vacinadas possuíam níveis de IgG séricos tão altos quanto os observados neste estudo (FLAMINIO et al., 1999).

Quando comparamos os resultados obtidos pelo S-ELISA com outros trabalhos (ERHARD, M H et al., 2001; SEDLINSKÁ et al., 2006), observamos que a concentração de IgG sérica dos potros de M1 a M3 foram maiores e em M5 foram semelhantes, a concentração de IgG sérico das éguas foi semelhante e o colostrais foi superior aos dados da literatura supracitada.

Os coeficientes de variação intra e inter-teste das curvas padrão ($CV < 9,5\%$ e $CV < 11,6\%$, respectivamente) e das amostras de soro e colostro ($CV < 9,7\%$ e $CV < 15,7\%$, respectivamente) foram menores que 16%, o que confere uma boa repetibilidade ao teste. O baixo CV aliado a exatidão de 96% das amostras controle sugerem uma boa acurácia do teste aqui proposto (GREINER; GARDNER, 2000; OIE, 2014).

Além da acurácia, outro aspecto interessante do sistema de S-ELISA, aqui demonstrado, foi a facilidade e rapidez dos resultados obtidos, pois da primeira fase (sensibilização da microplaca) até a leitura das placas foram de aproximadamente cinco horas, sendo mais rápido que o teste proposto por Erhard e colaboradores (2001) e o teste de IDRS por nós realizado, onde houve a necessidade de 24 horas de difusão para se realizar as leituras.

Quando comparamos os dois testes para determinação do IgG, realizados neste estudo, observamos que as concentrações séricas de IgG determinadas pela IDRS, em todas as amostras (soro, colostro e plasma) foram estatisticamente maiores ($P < 0,001$) do que pela técnica de S-ELISA. Entretanto, ambos resultados apresentaram forte correlação (figura 7). Esta diferença já foi evidenciada por outros pesquisadores que avaliaram a concentração de IgG em amostras de soro e colostro bovino através de ELISA e IDRS (GELSINGER et al., 2015). Até o presente momento não é do nosso conhecimento outro trabalho que tenha comparado a determinação de IgG em amostras de soro, plasma e colostro equino pelas técnicas de S-ELISA e IDRS.

Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparados os níveis de IgG sérico dos potros às 10, 24 e 48 horas de vida, em ambos os testes. No M2 (10 horas) os potros apresentavam níveis séricos de IgG maiores ($P < 0,01$) que o das éguas progenitoras no momento do parto. Assim consideramos que, com 10 horas de vida, os potros já se encontravam no pico de absorção de IgG, nas condições de manejo adotado pela propriedade monitorada.

Alguns autores sugerem o monitoramento da FTIP através da avaliação de PT e globulinas totais sérica (METZGER et al., 2006) e embora alguns trabalhos tenham encontrado melhor relação entre estas e a concentração de IgG sérico em potros (HURCOMBE et al., 2012; FOUCHÉ et al., 2014) do que os resultados aqui observados não é aconselhável utilizá-las rotineiramente para diagnóstico de FTIP, pois os resultados podem ser insidiosos e ocasionar a perda de potros por doenças devido resultados falso-negativos ou gastos dispendiosos por resultados falso-positivos (DAVIS; GIGUERE, 2005).

Houve forte correlação entre concentração da fração γ -globulina dos potros, nos cinco momentos, e concentração de IgG, corroborando com os valores relatados na literatura (HURCOMBE et al., 2012; FOUCHÉ et al., 2014). Porém, em 62% (62/100) das amostras, aqui analisadas, a fração γ -globulina foi menor que os valores encontrados para a concentração de IgG. Um fator deletério da técnica de eletroforese em gel de agarose é que devido a impurezas na agarose a eletroendosmose leva a uma quantidade da fração γ -globulina migrar em direção ao cátodo (KANEKO et al., 2008) isto pode ter influenciado na leitura e conseqüentemente subquantificação desta fração.

Nas condições aqui avaliadas, o teste Imunoenzimático rápido (SNAP teste) para detecção semiquantitativa de IgG utilizado a campo foi eficaz e o tempo de 10 horas de vida para avaliação se mostrou adequado. Embora não seja objetivo aqui avaliar o SNAP teste, estes resultados corroboram com avaliações feitas por outros pesquisadores anteriormente (MCCLURE et al., 2003; DAVIS; GIGUERE, 2005). Com a detecção precoce de FTIP é possível adotar medidas de suplementação de imunoglobulinas, tanto por colostro (banco de colostro) quanto por substitutos de colostro (FRANZ et al., 1998; HAMMER et al., 2000), aproveitando melhor capacidade de absorção pelos potros.

A concentração de IgG do grupo de potros não diferiu significativamente entre M3 e M4 (24-48) horas de vida (intervalo em que foi administrado um litro de plasma hiperimune). Aos 30 dias de vida houve uma diminuição significativa da concentração de IgG em todos os potros, o que era esperado já que o tempo de absorção é limitado, os níveis de IgG colostrais diminuem significativamente nas primeiras 24 horas pós-parto e existe um consumo e catabolismo dessas imunoglobulinas no processo de defesa contra antígenos ambientais (JEFFCOTT, 1974; CSAPÓ-KISS et al., 1995; FLAMINIO et al., 2000; RAIDAL et al., 2005). Todavia, aos trinta dias a média do grupo para a concentração de IgG foi quase o dobro do que é considerado como ideal (KOHN et al., 1989; MCCLURE et al., 2001).

Não foi encontrada correlação entre a concentração de IgG sérica e colostrada das éguas, corroborando com resultados observados por Kohn e colaboradores (1989). Houve fraca correlação positiva ($r=0,44$ e $P>0,05$) entre a densidade específica e índice BRIX do colostro no momento do parto.

Foi observada fraca, no entanto idêntica, correlação positiva ($r=0,47$; $P<0,05$) entre concentração de IgG determinado por S-ELISA e a densidade avaliada pelos dois tipos de colostrômetro ao contrário do observado por Korosue et al. (2012) que obtiveram correlação negativa entre índice BRIX e concentração de IgG de colostro de éguas. Não houve correlação entre densidade específica e IgG colostrada determinado por IDRS diferente do relatado pela literatura (LEBLANC et al., 1986, 1992; WAELCHLI et al., 1990). Quando correlacionado os níveis de IgG com índice BRIX das amostras de colostro encontramos resultados semelhantes aos da literatura (CHAVATTE et al., 1998; CASH, 1999).

Fatores como temperatura ambiente (Leblanc et al., 1986) e amostras com concentrações abaixo de 5.000 mg/dL de IgG (WAELCHLI et al., 1990) influenciam na densidade colostrar. Outro fator a ser levado em consideração é a idade das éguas aqui avaliadas que variou de 8 a 24 anos, além do tempo de gestação e número de partos que variaram de 316 a 355 dias e de 1 a 12 partos, respectivamente. Isto pode ter influenciado na correlação entre densidade específica e concentração de IgG, uma vez que ambas variáveis mudam conforme idade, número de partos, tempo de gestação e raça (WAELCHLI et al., 1990; LEBLANC et al., 1992).

Já foi demonstrado que potros saudáveis absorvem até 50% da IgG colostrar nas primeiras 12 horas de vida (RAIDAL et al., 2005). Todavia, aqui observamos fraca correlação ($r=0,46$ e $p<0,05$) entre a concentração de IgG colostrar no momento do parto e a concentração de IgG sérica dos potros, com 10 horas de vida, nos valores obtidos através de S-ELISA, corroborando com Erhard et al. (2001), e nenhuma correlação nos valores obtidos através de IDRS.

A IDRS é utilizada para determinação de IgG em várias espécies (FAHEY; MCKELVEY, 1965; MANCINI et al., 1965) com a finalidade de diagnóstico de FTIP em equinos serve como padrão de referência para outros testes diagnósticos de FTIP e de qualidade de colostro de éguas (LEBLANC et al., 1986; CHAVATTE et al., 1998; CASH, 1999; PUSTERLA et al., 2002; WONG et al., 2013). Do mesmo modo, a utilização de ensaios Imunoenzimático vem sendo amplamente utilizada, por permitir a detecção de anticorpos específicos com bastante sensibilidade (HIGUCHI et al., 1999; ERHARD, M. H. et al., 2001; MARTINS et al., 2010). Todavia, os resultados aqui obtidos pelo S-ELISA em 144 amostras avaliadas, foram significativamente menores que os da IDRS. Desta forma, corroborando com Gelsinger et al (2015), talvez não seja ideal a comparações entre os dois testes, pois a imunodifusão parece superestimar a concentração de IgG de amostras de soro, plasma e colostro equino em relação ao ELISA, que os subestima. E caso se utilize ensaios Imunoenzimático para rotina de diagnóstico de FTIP e/ou validação de outros testes, talvez, seja interessante rever os pontos de corte, visando minimizar os possíveis falso-positivos e conseqüentemente gastos desnecessários nas propriedades.

7 CONCLUSÃO

Nas condições do presente trabalho foi possível descrever parâmetros fisiológicos e comportamentais potros hípidos ao nascimento e clínicos do nascimento aos trinta dias de vida. Também foi possível verificar que as concentrações séricas de algumas frações proteicas de potros hípidos não dependem do colostro, pois já estavam em níveis semelhantes a animais adultos desde o nascimento, antes da primeira mamada.

A proteína total e globulinas totais se mostraram fracas indicadoras da concentração de IgG em amostras de soro de potros hípidos. Todavia, a proteína total estimada por refratômetro manual teve melhor correlação com a concentração de IgG destas amostras.

O colostrômetro de refração (índice BRIX) se mostrou melhor indicador da concentração de IgG em amostras de colostro colhidas imediatamente após o parto do que o colostrômetro de densidade específica utilizando as mesmas amostras após o congelamento.

Com o sistema de ELISA aqui proposto foi possível determinar concentrações de IgG em amostras de soro, plasma e colostro equino com uma boa repetibilidade e a capacidade de mensurar ampla variação de concentrações dentro de um mesmo teste. Além disto, os valores determinados por S-ELISA, apesar de mais altos, estavam mais próximos dos valores de gamaglobulina determinados através de eletroforese e isso nos sugere uma melhor precisão do teste de S-ELISA em relação a IDRS, nas condições aqui realizadas.

Concentrações de IgG determinadas por ELISA são subestimadas em relação ao IDRS, se fazendo necessário estabelecer novos pontos de corte para diagnóstico de FTIP caso se utilize o ELISA para tal fim.

8 AGRADECIMENTO

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão de bolsa de mestrado (processo nº 2014/13328-7).

9 REFERÊNCIAS

LANG, A.; SOUZA, M. V.; SALCEDO, J. H. P.; SOSSAI, S.; ARAÚJO, R. R.; LOURENÇO, G. G.; MAIA, L. IMUNIDADE PASSIVA EM EQUINOS: COMPARAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE IgG DO SORO MATERNO, COLOSTRO E SORO DO NEONATO. **Revista Ceres**, v. 54, n. 315, p. 405–411, 2007. Disponível em: <<http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/3256>>.

AUFFRAY, C.; FOGG, D.; GARFA, M.; et al. Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. **Science**, v. 317, n. 5838, p. 666–670, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1142883>>.

BALSON, G. A; SMITH, G. D.; YAGER, J. A. Immunophenotypic analysis of foal bronchoalveolar lavage lymphocytes. **Veterinary microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 237–46, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9226838>>.

BEETSON, S. A.; HILBERT, B. J.; MILLS, J. N. The use of the glutaraldehyde coagulation test for detection of hypogammaglobulinaemia in neonatal foals. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n. 8, p. 279–281, 1985. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.1985.tb14252.x>>.

BIEBL, A.; GRILLENBERGER, A.; SCHMITT, K. Enema-induced severe hyperphosphatemia in children. **European Journal of Pediatrics**, v. 168, n. 1, p. 111–112, 2009.

BOLLAG, D.M; ROZYCKI, M.D.; EDELSTEIN, S. J. **Protein Methods, 2nd Edition**. 1996.

CASH, R. S. G. Colostral quality determined by refractometry. **Equine Veterinary Education**, v. 11, p. 36–38, 1999.

CASTON, S. S.; MCLURE, S. R.; MARTENS, R. J.; et al. Effects of Hyperimmune Plasma on the Severity of Pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in Experimentally Infected Foals. **Veterinary Therapeutics**, v. 7, n. 4, p. 361–375, 2006.

CAUCHARD, J.; SEVIN, C.; BALLEST, J.-J.; TAOUJI, S. Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. **Veterinary microbiology**, v. 104, n. 1-2, p. 73–81, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530741>>. Acesso em: 24/2/2014.

CHAVATTE, P.; CLE, F.; CASH, R.; BIOL, M. I.; GRONGNET, J. Field Determination of Colostrum Quality by Using a Novel, Practical Method. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 1998. **Proceedings...** v. 44, 1998.

CLABOUGH, D. L.; LEVINE, J. F.; GRANT, G. L.; CONBOY, H. S. Factors associated with failure of passive transfer of colostrum antibodies in Standardbred

foals. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 5, n. 6, p. 335–40, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1779427>>.

CROWTHER, J. R. **The ELISA Guidebook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.

CSAPÓ-KISS, Z.; STEFLER, J.; MARTIN, T. G.; MAKRAY, S.; CSAPÓ, J. Composition of mares' colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and contents of macro and micro-elements. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 4, p. 403–415, 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/095869469400014G>>.

DAVIS, R.; GIGUERE, 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 10, p. 1640–1645, 2005. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.2005.227.1640>>.

DAWSON, T. R. M. Y.; HOROHOV, D. W.; MEIJER, W. G.; MUSCATELLO, G. Veterinary Immunology and Immunopathology Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 1-2, p. 1–11, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.004>>.

DEMMERS, S.; JOHANNISSON, A.; GRÖNDAHL, G.; JENSEN-WAERN, M. Neutrophil functions and serum IgG in growing foals. **Equine veterinary journal**, v. 33, n. 7, p. 676–680, 2001.

DI FILIPPO, P. A.; NOGUEIRA, A. F. S.; ANAI, L. A.; ALVES, A. E.; SANTANA, A. E.; PEREIRA, G. T. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E DO LÍQUIDO PERITONEAL DE EQUINOS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO EXPERIMENTAL DO DUODENO, ÍLEO E CÓLON MAIOR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 938–946, 2010. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/cab/article/view/8783/9275>>.

DUGGAN, V. E.; HOLYOAK, G. R.; MACALLISTER, C. G.; COOPER, S. R.; CONFER, A. W. Amyloid A in equine colostrum and early milk. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 121, p. 150–155, 2008.

ERHARD, M. H.; LUFT, C.; REMLER, H. P.; STANGASSINGER, M. Assessment of colostrum transfer and systemic availability of immunoglobulin G in new-born foals using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 85, n. 5-6, p. 164–73, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686785>>.

ERHARD, M. H.; LUFT, C.; REMLER, H. P.; STANGASSINGER, M. Assessment of colostrum transfer and systemic availability of immunoglobulin G in new-born foals using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 85, n. 5-6, p.

164–73, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686785>>.

FAHEY, J. L.; MCKELVEY, E. M. Quantitative Determination of Serum Immunoglobulins in Antibody-Agar Plates. **The Journal of Immunology**, v. 94, n. 1, p. 84–90, 1965. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/94/1/84>>.

FAVERO, D. H. M. F.; DIAS, D. P. M.; FERINGER-JUNIOR, W. H.; BERNARDI, N. S.; LACERDA-NETO, J. C. DE. Proteínas séricas de potros da raça Puro Sangue Árabe recém-desmamados ou com mais de trinta dias de desmame. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 89–93, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011001300015&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

FLAMINIO, M. J. B. .; RUSH, B. R.; DAVIS, E. G.; et al. Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 3-4, p. 267–285, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242700001495>>.

FLAMINIO, M. J. B. F.; RUSH, B. R.; SHUMAN, W. Peripheral Blood Lymphocyte Subpopulations and Immunoglobulin Concentrations in Healthy Foals and Foals with *Rhodococcus equi* Pneumonia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 206–212, 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-1676.1999.tb02180.x>>.

FOUCHÉ, N.; GRAUBNER, C.; HOWARD, J. Correlation between serum total globulins and gamma globulins and their use to diagnose failure of passive transfer in foals. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 202, n. 2, p. 384–386, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25201248>>.

FRAPE, D. **EQUINE NUTRITION AND FEEDING - THIRD EDITION**. 3º ed. 2004.

FREY JUNIOR, F. **Índices epidemiológicos em Potros Puro Sangue Inglês, do nascimento até os seis meses de vida, na região de Bagé-RS**. 2006. 42f. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FRYMUS, T.; SCHOLLENBERGER, A. Circulating B and T Lymphocytes in Foals During First Five Months of Life. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 26, n. 9, p. 722–728, 1979. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0450.1979.tb00866.x>>.

GELSINGER, S. L.; SMITH, A. M.; JONES, C. M.; HEINRICHS, A. J. Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 6, p. 4084–9, 2015. American Dairy Science Association. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215002192>>.

GIGUÈRE S, GASKIN JM, MILLER C, B. J. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired

pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 1, n. 220(1), p. 59–63., 2002.

GIGUÈRE, S.; POLKES, A. C. Immunologic disorders in neonatal foals. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 21, n. 2, p. 241–272, 2005.

GODOY, R. F.; SANTANA, A. E.; CAMPOS FILHO, E.; OLIVEIRA, J. V. Estudo eritroleucométrico e proteinograma sérico do sangue do cordão umbilical e jugular de equinos ao nascimento e de suas respectivas mães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1376–1381, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000600004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

GOODMAN, L. B.; WAGNER, B.; FLAMINIO, M. J. B. F.; SUSSMAN, K. H.; METZGER, S. M.; HOLLAND, R.; OSTERRIEDER, N. Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). **Vaccine**, v. 24, n. 17, p. 3636–3645, 2006.

HAAS, S. D.; BRISTOL, F.; CARD, C. E. Risk factors associated with the incidence of foal mortality in an extensively managed mare herd. **The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne**, v. 37, n. 2, p. 91–5, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1576626&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. .

HAMMER, C. J. .; TYLER, H. D. .; MILLER, P. A. EFFECTS OF ORAL ADMINISTRATION OF CONCENTRATED EQUINE SERUM IgG TO NEWBORN FOALS ON PASSIVE IMMUNITY. **Journal Of Equine Veterinary Science**, v. 20, n. 5, p. 337–338, 2000.

HICKMAN, S. A.; GILL, M. S.; MARKS, S. L.; SMITH, J. A.; SOD, G. A. Phosphate enema toxicosis in a pygmy goat wether. **Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 10, p. 849–851, 2004.

HIETALA, S. K.; ARDANS, A. A. Neutrophil phagocytic and serum opsonic response of the foal to. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 14, n. 3, p. 279–294, 1987. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3109114>.

HIGUCHI, T.; ARAKAWA, T.; HASHIKURA, S.; et al. Effect of prophylactic administration of hyperimmune plasma to prevent *Rhodococcus equi* infection on foals from endemically affected farms. **Journal of veterinary medicine.**, v. 46, n. 9, p. 641–8, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605374>>. .

HOFSAESS, F. R. TIME OF ANTIBODY ABSORPTION IN NEONATAL FOALS. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 4, p. 158–159, 2001.

HURCOMBE, S. D. A.; MATTHEWS, A. L.; SCOTT, V. H. L.; SCOTT, V. H. L.; WILLIAMS, J. M.; KOHN, C. W.; TORIBIO, R. E. Serum protein concentrations as predictors of serum immunoglobulin G concentration in neonatal foals. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 22, n. 5, p. 573–579, 2012.

JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. H. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. **Equine Veterinary Education**, v. 19, n. 1, p. 38–46, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3292.2007.tb00550.x/epdf>>. .

JEFFCOTT, L. B. PASSIVE IMMUNITY AND ITS TRANSFER WITH SPECIAL REFERENCE TO THE HORSE. **Biological Reviews**, v. 47, n. 4, p. 439–464, 1972. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-185X.1972.tb01078.x>>. .

JEFFCOTT, 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4137197>>. .

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 2008.

KNOTTENBELT, D. C.; LEBLANC, M.; LOPATE, C.; PASCOE, R. R. **Equine Stud Farm Medicine and Surgery**. Elsevier Science Limited. 2003.

KOHN, C. W.; KNIGHT, D.; HUESTON, W.; JACOBS, R.; REED, S. M. Colostral and serum IgG, IgA, and IgM concentrations in Standardbred mares and their foals at parturition. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 1, p. 64–68, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2759897>>. .

KOROSUE, K.; MURASE, H.; SATO, F.; ISHIMARU, M.; KOTOYORI, Y.; NAMBO, Y. Correlation of Serum IgG Concentration in Foals and Refractometry Index of the Dam's Pre- and Post-Parturient Colostrums: An Assessment for Failure of Passive Transfer in Foals. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 11, p. 1387–1395, 2012. Disponível em: <<http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/jvms/11-0470?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>>. .

KURTZ FILHO, M.; DEPRÁ, N.M.; LOPES DE ALDA, J.; CASTRO, I.N.; DE LA CORTE, F.D.; SILVA, C. A. M. Parâmetros fisiológicos e etológicos do potro recém-nascido, na raça puro-sangue de corrida. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, n. 2, p. 103–108, 1997.

LEBLANC, M. M.; HURTGEN, J. P.; LYLE, S. A modified zinc sulfate turbidity test for the detection of immune status in newlyborn foals. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 36–39, 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080606800808>>. .

LEBLANC, M. M.; MCLAURIN, B. I.; BOSWELL, R. Relationships among serum immunoglobulin concentration in foals, colostral specific gravity, and colostral

immunoglobulin concentration. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 1, p. 57–60, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3733502>>. .

LEBLANC, M. M.; TRAN, T.; BALDWIN, J. L.; PRITCHARD, E. L. Factors that influence passive transfer of immunoglobulins in foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 2, p. 179–83, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1559872>>. .

LEWIS, M. J.; WAGNER, B.; WOOF, J. M. The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 3, p. 818–827, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589007004208>>.

LOPEZ, A. M.; HINES, M. T.; PALMER, G. H.; ALPERIN, D. C.; HINES, S. A. Identification of Pulmonary T-Lymphocyte and Serum Antibody Isotype Responses Associated with Protection against *Rhodococcus equi*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1270–1276, 2002. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CDLI.9.6.1270-1276.2002>>.

LU, K. G.; BARR, B. S.; EMBERTSON, R.; SCHAER, B. D. Dystocia-A True Equine Emergency. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 5, n. 2, p. 145–153, 2006.

LUZ, I. N. C. DA; CORTE, F. D. D. LA; ALDA, J. L. DE; SILVA, C. A. M. AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA SÉRICA APÓS PLASMOTERAPIA EM POTROS PURO SANGUE DE CORRIDA. **Ciência Rural**, v. 21, n. 3, p. 415–420, 1991. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781991000300009&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. .

MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v. 2, n. 3, p. 235–IN6, 1965. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0019279165900042>>. .

MARTI, E.; EHRENSPERGER, F.; BURGER, D.; OUSEY, J.; DAY, M. J.; WILSON, A. D. Maternal transfer of IgE and subsequent development of IgE responses in the horse (*Equus caballus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 203–211, 2009.

MARTINS, C. B.; SILVA, M. A. G. DA; DUARTE, C. A.; SILVA, M. A. G.; DUARTE, C. A.; ALBERNAZ, R. M.; LACERDA NETO, J. C. MACHADO, R. Z. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Rhodococcus equi* EM ÉGUAS VACINADAS E POTROS PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 194–200, 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/5207>>. Acesso em: 24/2/2014.

MCCLURE, J. T.; DELUCA, J. L.; LUNN, D. P.; MILLER, J. Evaluation of IgG concentration and IgG subisotypes in foals with complete or partial failure of

passive transfer after administration of intravenous serum or plasma. **Equine veterinary journal**, v. 33, n. 7, p. 681–686, 2001.

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. Proceedings AAEP 49th AAEP Ann Conv. **Proceedings...** v. 49, p.301–305, 2003. Disponível em: <<http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2005/20053193194.pdf>>.

MCDONALD, T. L.; LARSON, M. A.; MACK, D. R.; WEBER, A. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A3 (M-SAA3) into colostrums. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 83, p. 203–211, 2001.

MCTAGGART, C.; PENHALE, J.; RAIDAL, S. Effect of plasma transfusion on neutrophil function in healthy and septic foals. **Australian Veterinary Journal**, v. 83, n. 8, p. 499–505, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.2005.tb13304.x>>.

MCTAGGART, C.; YOVICH, J. V.; PENHALE, J.; RAIDAL, S. L. A comparison of foal and adult horse neutrophil function using flow cytometric techniques. **Research in Veterinary Science**, v. 71, n. 1, p. 73–79, 2001.

MIZUKOSHI, F.; MAEDA, K.; HAMANO, M. IgG antibody subclass response against equine herpesvirus type 4 in horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 1-2, p. 97–101, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242702001307>>.

MORLEY, P. S.; TOWNSEND, H. G. G. A survey of reproductive performance in Thoroughbred mares and morbidity, mortality and athletic potential of their foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 4, p. 290–297, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.1997.tb03126.x/abstract>>.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28–40, 2004.

NELSON, K. Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination. **Vaccine**, v. 16, n. 13, p. 1306–1313, 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X98000097>>.

OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Validation Guideline 3.6.1 Development and Optimisation of Antibody Detection Assays**. , 2014. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.1_ANTIBODY_DETECT.pdf>.

OUCHTERLONY, Ö. ANTIGEN-ANTIBODY REACTIONS IN GELS. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 32, n. 2, p. 231–240, 1953. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504404>>. .

PALTRINIERI, S.; GIORDANO, A.; VILLANI, M. Influence of age and foaling on plasma protein electrophoresis and serum amyloid A and their possible role as markers of equine neonatal septicaemia. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644376>>. .

PARADIS, M. R. **Equine Neonatal Medicine: A Case-Based Approach**. Philadelphia, PA: Copyright © 2006 by Elsevier Inc., 2006.

PEEK, S. F.; SEMRAD, S.; MCGUIRK, S. M. Prognostic Value of Clinicopathologic Variables Obtained at Admission and Effect of Antiendotoxin Plasma on Survival in Septic and Critically Ill Foals. **J Vet Intern Med**, v. 20, p. 569–574, 2006.

PUSTERLA, N.; PUSTERLA, J. B.; SPIER, S. J.; PUGET, B.; WATSON, J. L. Evaluation of the SNAP foal IgG test for the semiquantitative measurement of immunoglobulin G in foals. **The Veterinary record**, v. 151, n. 9, p. 258–260, 2002.

RAIDAL, S. L.; MCTAGGART, C.; PENHALE, J. Effect of withholding macromolecules on the duration of intestinal permeability to colostral IgG in foals. **Australian veterinary journal**, v. 83, n. 1-2, p. 78–81, 2005.

RIBAS, L. D. M.; MORAES, C. M.; LINS, L. A.; FLORES, E. F.; NOGUEIRA, C. E. W. Fatores de risco associados a doenças respiratórias em potros Puro Sangue Inglês do nascimento ao sexto mês de vida. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1789–1794, 2009.

RIOND, B.; WENGER-RIGGENBACH, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Serum protein concentrations from clinically healthy horses determined by agarose gel electrophoresis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 1, p. 73–77, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-165X.2008.00100.x>>. .

RYAN, C. A.; SANCHEZ, L. C. Nondiarrheal disorders of the gastrointestinal tract in neonatal foals. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 21, n. 2, p. 313–332, 2005.

SEDLINSKÁ, M.; KREJČÍ, J.; VYSKOČIL, M.; KUDLÁČKOVÁ, H. Postnatal Development of Blood Serum Concentrations of Immunoglobulin IgG, IgA and IgM Isotypes in Suckling Foal. **Acta Veterinaria Brno**, v. 75, n. 2, p. 175–182, 2006. Disponível em: <<http://actavet.vfu.cz/75/2/0175/>>.

SHEORAN, A. S.; HOLMES, M. A. Separation of equine IgG subclasses (IgGa, IgGb and IgG(T)) using their differential binding characteristics for staphylococcal protein A and streptococcal protein G. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, n. 1-3, p. 33–43, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242796056188>>.

SHEORAN, A. S.; TIMONEY, J. F.; HOLMES, M. A.; KARZENSKI, S. S.; CRISMAN, M. V. Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 9, p. 1099–1105, 2000. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2000.61.1099>>. .

SMITH III, R.; CHAFFIN, M. K.; COHEN, N. D.; MARTENS, R. J. Age-related changes in lymphocyte subsets of Quarter Horse foals. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 4, p. 531–537, 2002. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2002.63.531>>.

TIETZ, N.W. 1970. **Fundamentals of Clinical Chemistry**. Saunders:Toronto.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology An Introducion 7º Ed.** 7th ed. 2004.

TÓTHOVÁ, C.; NAGY, O.; SEIDEL, H.; KOVÁČ, G. Serum protein electrophoretic pattern in clinically healthy calves and cows determined by agarose gel electrophoresis. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 1, p. 15–20, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00580-011-1363-8>>. .

TYLER-MCGOWAN, C.; HODGSON, J.; HODGSON, D. 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. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.1997.tb13832.x>>. .

VARGAS, M.; SEGURA, Á.; VILLALTA, M. Purification of equine whole IgG snake antivenom by using an aqueous two phase system as a primary purification step. **Biologicals**, v. 43, n. 1, p. 37–46, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105614000992>>. .

VICTORIA CARAPETO, M.; BARRERA, R.; CINTA M. M.; ZARAGOZA, C. Serum α -globulin fraction in horses is related to changes in the acute phase proteins. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 3, p. 120–127, 2006.

WÄLCHLI, R. O.; HÄSSIG, M.; EGGENBERGER, E.; NUSSBAUMER, M. Relationships of total protein, specific gravity, viscosity, refractive index and latex agglutination to immunoglobulin G concentration in mare colostrum. **Equine veterinary journal**, v. 22, n. 1, p. 39–42, 1990.

WAGNER, B. Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, n. 1-2, p. 155–164, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145305X05001412>>.

WAGNER, B.; FLAMINIO, J. B. F.; HILLEGAS, J.; et al. Occurrence of IgE in foals: evidence for transfer of maternal IgE by the colostrum and late onset of endogenous IgE production in the horse. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 110, n. 3-4, p. 269–78, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343646>>. .

WAGNER, B.; GREISER-WILKE, I.; WEGE, A. K.; RADBRUCH, A.; LEIBOLD, W. Evolution of the six horse IGHG genes and corresponding immunoglobulin

gamma heavy chains. **Immunogenetics**, v. 54, n. 5, p. 353–364, 2002.

WAGNER, B.; MILLER, D. C.; LEAR, T. L.; ANTCZAK, D. F. The Complete Map of the Ig Heavy Chain Constant Gene Region Reveals Evidence for Seven IgG Isotypes and for IgD in the Horse 1,2. , 2004.

WALKER, J. M. **The Protein Protocols Handbook - Second Edition**. 2002.

WILLIAMSON, A.; ROGERS, C. W.; FIRTH, E. C. A survey of feeding, management and faecal pH of Thoroughbred racehorses in the North Island of New Zealand. **New Zealand veterinary journal**, v. 55, n. 6, p. 337–341, 2007.

WOHLFENDER, F. D.; BARRELET, F. E.; DOHERR, M. G.; STRAUB, R.; MEIER, H. P. Diseases in neonatal foals . Part 1: The 30 day incidence of disease and the effect of prophylactic antimicrobial drug treatment during the first three days post partum. , v. 41, n. June 2005, p. 179–185, 2009.

WONG, D. M.; GIGUÈRE, S.; WENDEL, M. A. Evaluation of a point-of-care portable analyzer for measurement of plasma immunoglobulin G, total protein, and albumin concentrations in ill neonatal foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 6, p. 812–9, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23445294>>.

10 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista "Pesquisa Veterinária Brasileira".

PROTEINOGRAMA E CONCENTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G SÉRICOS EM POTROS, DO NASCIMENTO AOS TRINTA DIAS DE VIDA, TRATADOS COM PLASMA.

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the protein concentrations and serum IgG in newborns foals up to thirty days of life before and after suckling colostrum, be treated with plasma, through a new direct enzyme immunoassay test (ELISA), and assess the quality of colostrum and plasma used. To this, 20 foals and their mothers were used and four donor animals (plasma). Both progenitor mares as donors were subjected to immunization protocols. Blood samples were taken from foals in five times (M1 = zero, M2 = ten M3 = 24, M4 = 48 hours and M5 = 30 days) blood and colostrum progenitor mares at foaling. Biochemical analyzer determined the concentration of the total protein (TP) and albumin and PT was also measured by refractometer. The protein fractionation was performed by agarose gel electrophoresis, addition of albumin was possible to obtain the fractionation α_1 , α_2 , β and γ -globulins. The total globulin, the serum and plasma samples was estimated by subtracting the biochemical values of albumin PT values.. The density of colostrum was evaluated using two colostrometer, a refractive BRIX and other specific density. Total IgG concentration of all samples was determined by new ELISA system. The mean \pm standard deviation of the serum IgG of foals at birth, was of 15 ± 8 mg / dL, with ten hours of life was 2.408 ± 608 mg / dL remained at similar levels up to 48 hours (2.364 ± 784 mg / dL) and decreased significantly to 30 days of age (1.414 ± 586 mg / dL). Serum IgG and colostral were 1.746 ± 505 mg / dL and 7.714 ± 2.619 mg / dL, respectively. The plasma IgG concentrations used for treatment of foals was 2.026 ± 148 mg / dL. With the system proposed here ELISA was possible to determine IgG concentrations in serum, plasma and horse colostrum with a good reproducibility and the ability to measure wide range of concentrations within a test.

INDEX TERMS: Foals, proteinogram, electrophoresis, immunoglobulins, plasma.

RESUMO - Este trabalho teve por objetivo avaliar o proteinograma e concentrações séricas de IgG em potros do nascimento aos trinta dias, antes e depois de mamarem colostro e serem tratados com plasma, através de um novo teste de Imunoensaio enzimático direto (ELISA), bem como avaliar a qualidade do colostro e plasma utilizados. Para tal, foram utilizados 20 potros e suas respectivas mães, além de quatro animais doadores (plasma). Tanto as éguas progenitoras quanto os doadores foram submetidos a protocolos de imunização. Foram colhidas amostras de sangue dos potros em cinco momentos (M1= zero, M2= dez, M3= 24, M4= 48 horas e M5= 30 dias de vida), sangue e colostro das éguas progenitoras no momento do parto. A concentração de proteína total (PT) e Albumina foi determinada através de analisador bioquímico e a PT também foi avaliada através de refratômetro manual. O fracionamento proteico foi realizado através de eletroforese em gel de agarose, além da Albumina foi possível obter o fracionamento de α_1 , α_2 , β e γ -globulinas. A Globulina total, das amostras de soro e plasma, foi estimada através da subtração dos valores bioquímicos de Albumina dos valores de PT. A densidade do colostro foi avaliada através de dois colostrômetros, um de refração BRIX e outro de densidade específica. A concentração de IgG total de todas as amostras foi determinada através de um novo sistema de ELISA. A média \pm desvio padrão da concentração sérica de IgG dos potros ao nascer, foi de 15 ± 8 mg/dL, com dez horas de vida foi de 2.408 ± 608 mg/dL, se mantiveram em níveis semelhantes até 48 horas (2.364 ± 784 mg/dL) e diminuíram significativamente aos 30 dias de vida (1.414 ± 586 mg/dL). Os níveis séricos e colostrais de IgG foram de 1.746 ± 505 mg/dL e 7.714 ± 2619 mg/dL, respectivamente. A concentração de IgG do plasma utilizado na transfusão dos potros foi de 2.026 ± 148 mg/dL. Com o sistema de ELISA aqui proposto foi possível determinar concentrações de IgG em amostras de soro, plasma e colostro equino com uma boa repetibilidade e a capacidade de mensurar ampla variação de concentrações dentro de um mesmo teste.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: potros, proteinograma, eletroforese, imunoglobulina, plasma.

INTRODUÇÃO

Potros são considerados agamaglobulinêmicos ao nascerem devido a placentação da égua ser do tipo epiteliocorial e assim praticamente impermeável às imunoglobulinas. Por isso, são muito dependentes da transferência passiva de imunoglobulinas através do colostro como forma de defesa alternativa (JEFFCOTT, 1974; LEBLANC et al., 1992). Outro fator importante é a capacidade de absorção de imunoglobulinas colostrais, pelo epitélio intestinal, dos potros que reduz significativamente após 12 horas de vida, caindo de 50% para 28% da quantidade de imunoglobulinas G (IgG) ingerida (JEFFCOTT, 1974; RAIDAL et al., 2005).

Níveis séricos de IgG acima de 800 mg/dL, nas primeiras 12 horas de vida, são considerados adequados, enquanto que valores entre 800-400 mg/dL e abaixo de 400 mg/dL são considerados falha parcial de transferência de imunidade passiva (FPTIP) e falha total (FTIP), respectivamente (MCGUIRE et al., 1977; BALDWIN et al., 1991; MCCLURE et al., 2003).

A FTIP é associada desenvolvimento de doenças infecciosas e septicemia neonatal (CLABOUGH et al., 1991; TYLER-MCGOWAN et al., 1997). Estudos epidemiológicos demonstraram que até 74% em potros com FTIP vão a óbito (HAAS et al., 1996). Assim, há uma recomendação de que potros com índices de Ig < 800 mg/dL nas primeiras nove horas de vida devem ser suplementados com colostro (HOFSAESS, 2001). Outra medida, embora controversa, que pode ser adotada com potros susceptíveis é a administração de plasma hiperimune (HIGUCHI et al., 1999; CASTON et al., 2006; GIGUÈRE et al., 2002). A ocorrência de FTIP segundo a literatura internacional varia de 16% a 37,8% (TYLER-MCGOWAN et al., 1997; MCCLURE et al., 2003) e a maior complicação desta condição é a susceptibilidade destes animais a enfermidades infecciosas, principalmente as que acometem o sistema respiratório causando grandes prejuízos a equinocultura (PEIRÓ et al., 2002).

A imunodifusão radial simples (IDRS) é um método direto utilizado para diagnóstico de FTIP em potros, sendo considerada “padrão ouro” por vários pesquisadores (LEBLANC et al. 1986, GIGUÈRE et al. 2002, LANG et al. 2007). Outro método direto que tem sido utilizado para avaliar concentrações de subtipos de imunoglobulinas antígeno-específicas em laboratórios são os ensaios Imunoenzimático (ELISA), pois permitem uma avaliação com alta sensibilidade e especificidade de um grande número de amostras em cada teste (HIGUCHI et al. 1999, ERHARD et al. 2001, MARTINS et al. 2010).

Diante do cenário nacional do agronegócio equídeo que movimenta anualmente bilhões de reais com a produção de cavalos e as possíveis perdas econômicas que a FTIP pode acarretar aos proprietários, este trabalho teve por objetivo avaliar o proteinograma e a cinética de imunoglobulinas G de potros, do nascimento aos 30 dias de vida, antes e após ingerirem colostro e serem tratados com plasma, além de verificar possíveis correlações que permitam estimar a concentração de IgG sérica de potros e do colostro de éguas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Todos os animais utilizados neste experimento pertenciam a um haras do interior do estado de São Paulo. A realização deste trabalho foi autorizada pelo responsável pela propriedade e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista FMVZ/ UNESP – Campus de Botucatu (protocolo nº 173/2015).

Foram utilizadas 20 éguas da raça Puro Sangue Inglês e seus respectivos potros durante uma estação de nascimentos de um haras de criação localizado no estado de São Paulo. A média de idade e tempo de gestação das éguas progenitoras foi de 13±5 anos e 330±11 dias, respectivamente. Dos 20 potros incluídos neste estudo 12 eram machos (60%) e 8 fêmeas (40%), o peso e altura média ao nascer foi de 51,24±7,31 kg e 99,75±5,06 cm, respectivamente. Também foram utilizadas quatro fêmeas adultas (três da raça Bretão e uma Percheron), pesando entre 630 e 700kg como doadores de plasma. Todos os animais eram mantidos sob as mesmas condições de manejo em piquetes com capim *Coast-Cross* e água à vontade, todos suplementados com ração e sal mineralizado. Durante os 15 dias que antecederam o parto de cada égua, as mesmas eram diariamente conduzidas para a maternidade onde passavam a noite em observação. Todos os partos foram assistidos e ocorreram em baias maternidade, as quais foram devidamente limpas e desinfetadas no intervalo entre cada parto.

Além do exame físico todos os potros foram submetidos a teste para diagnóstico de FTIP através de kit comercial²³, segundo recomendações do fabricante, utilizando-se sangue total colhido da veia jugular externa em tubo a vácuo com EDTA 10 horas após nascimento.

Esquema de imunização

Os animais doadores foram vacinados em dois momentos com intervalo de 30 dias, sendo que em cada momento receberam vacinas contra encefalomielite²⁴, rinopneumonite¹, influenza¹, tétano¹, *Rhodococcus equi*²⁵, *E. coli*²⁶, *Salmonella*³, *Klebsiella*³, *Streptococcus equi*²⁷ e Leptospirose²⁸. E após 25 dias da segunda dose foi realizada a colheita de sangue para extração do plasma.

As éguas PSI foram vacinadas 45 e 15 dias antes da data prevista para o parto contra *Rhodococcus equi*, *E. coli*, *Salmonella* e *Klebsiella*, além das vacinas do calendário normal de imunização do haras que consistia em vaciná-las no 5º, 7º e 9º meses de prenhez com a vacina comercial contra Herpes vírus tipo I e IV²⁹ e anualmente contra encefalomielite¹, rinopneumonite¹, influenza¹, tétano¹, *Streptococcus equi*⁴, raiva³⁰ e leptospirose⁵.

Colheita, Extração e Administração do Plasma Hiperimune.

Após as colheitas de sangue dos doadores, as bolsas de sangue foram encaminhadas ao Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ-UNESP de Botucatu, centrifugadas e o plasma extraído para a bolsa satélite e congelado (-20°C) num prazo de seis horas após as colheitas do sangue total. Cada potro recebeu 1 litro de plasma, independente do peso do animal, e para isto foi realizada tricotomia, antisepsia e acesso na veia jugular, com cateter endovenoso 16 G acoplado a um equipo de transfusão.

Colheita das amostras

As amostras de sangue das éguas e seus respectivos potros foram colhidas por venopunção da jugular utilizando coletor com agulha para coleta múltipla - 21G1³¹ e acondicionadas em frascos sem anticoagulante e após a retração do coágulo foram centrifugadas (1.800 x g) para obtenção do soro.

Durante o processo de extração de plasma dos doadores foi separado uma alíquota de plasma. Amostras de sangue e colostro das éguas foram colhidas no momento do parto. A colheita de sangue dos potros ocorreu em cinco momentos: M1 - logo após o parto, previamente a primeira mamada do colostro; M2 - com dez horas de vida; M3 - com 24 horas de vida (logo após a colheita foi realizada a transfusão do plasma); M4 - com 48 horas de vida (24 horas após a transfusão do plasma); M5 - aos 30 dias de vida. Em todos os momentos de colheita de sangue dos potros foram registrados os dados do exame físico (Frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal).

Todas as amostras colhidas foram armazenadas em tubos plásticos e congeladas a -20º C até o momento das análises laboratoriais.

Visando respeitar as condições estabelecidas pela propriedade onde foram realizadas as coletas dos dados, não foi possível utilizar um grupo de potros como controle, ou seja, sem receber plasma ou sem mamar colostro, uma vez que isto iria alterar o manejo profilático da propriedade aumentando o risco de problemas infecciosos.

Proteína total e frações proteicas séricas

A concentração da proteína total (PT) do soro sanguíneo das éguas PSI, seus respectivos potros e os animais doadores foi mensurada através de dois métodos, primeiro utilizando

²³ SNAP® foal IgG test - IDEXX Lab. Inc. Westbrook, Maine - USA.

²⁴ LEXINGTON-8® - Lab. Vencofarma do Brasil. Londrina - PR.

²⁵ RHODOVAC® - Clínica Equina SRL. Cap. Sarmiento - Argentina.

²⁶ AUTOVACUNA® - Dr. L. Pompeo S. Arg.

²⁷ STREPTOVAC - Sorocaba - SP

²⁸ LEPTOEQUUS - Lab. Vencofarma do Brasil. Londrina - PR.

²⁹ HERPES-HORSE® - Lab. Vencofarma do Brasil. Londrina - PR.

³⁰ BGS-CELL® - Hertape Calier Saúde Animal S/A. Juatuba - MG

³¹ BD Vacutainer® - Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA.

refratômetro manual e depois analisador bioquímico semiautomático³² usando kit comercial³³ para dosagem direta da concentração de proteínas séricas totais através do método colorimétrico de Biureto (Tietz 1970). Utilizando mesmo analisador bioquímico foi avaliado a concentração de albumina das amostras pelo método colorimétrico Verde de Bromocresol³⁴ (TIETZ, 1970).

As frações proteicas (Albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas e γ -globulinas) foram obtidas pela técnica de eletroforese em gel de agarose corado com amido negro (0,1%) em ácido acético a 5%, segundo as técnicas descritas por Naoum (1999) e a leitura das frações proteicas foi realizada em "scanner". O valor de proteína total utilizado para esta técnica foi o obtido pela técnica do biureto em analisador bioquímico.

A concentração da globulina total sérica (GT) das amostras de soro e plasma foram determinadas através dos valores das concentrações de albumina subtraída da proteína total: [Globulina total] = [proteína total] - [Albumina]. Para tal foram utilizados os valores de Albumina e proteína total obtidos por reação colorimétrica em analisador bioquímico.

Determinação da concentração de IgG total

Para a quantificação de IgG total das amostras de plasma, soro e colostro foi utilizado o método de Ensaio Imunoenzimático direto "sanduiche" - S-ELISA descrito por Erhard, et al., (2001) com modificações. Para a realização do S-ELISA proposto foi necessária a purificação de IgG equino e produção de antissoro anti-IgG equino.

Purificação IgG equino utilizado como padrão

O processo de purificação, avaliação da pureza e quantificação do IgG equino seguiu a técnica descrita por Bollag e colaboradores (1996). Para tal, uma amostra de sangue total de um equino hígido, macho, adulto foi colhida por venopunção da jugular externa e acondicionada em frasco sem anticoagulante, após a retração do coágulo, centrifugou-se a 1500 x g durante dez minutos para obtenção do soro.

Foi realizada purificação em coluna de afinidade (HiTrap Protein G HP)³⁵ de 5 ml, utilizando tampão de ligação fosfato de sódio 20mM e pH 7,0 e tampão de eluição Glicina-HCL 0,1M e pH 2,7.

A amostra foi diluída em tampão de ligação na proporção de 1:1 e filtrada em filtro de 0,45nm para retirada de impurezas. A coluna de proteína G foi lavada com tampão de ligação na velocidade de 5ml/minuto durante 30 minutos e então foi realizada a eluição da amostra na velocidade de 5ml/minuto e colhidas em alíquotas que foram acondicionadas em tubos plásticos de 1ml. O pH de cada alíquota foi neutralizado com Tris a 1 mol/L.

Para a caracterização da imunoglobulina G obtida, as amostras alíquotas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com azul de coomassie. Após a realização do SDS-PAGE foram separadas as amostras mais puras (sem bandas adicionais) e realizada a quantificação proteica pelo método de BCA (ácido bicinonínico) e a leitura em espectrofotômetro com absorvância de 562nm. Foi utilizado IgG humano como padrão, as médias das densidades ópticas (D.O.) foram correlacionadas com as concentrações padrão utilizadas (1mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125mg/mL; 0,0625 mg/mL; 0,03125 mg/mL; 0,01562 mg/mL; 0,0781 mg/mL; 0,0390 mg/mL) e a equação gerada pela regressão linear ($R^2=0,9958$) foi utilizada para estimar a concentração de IgG equino purificado.

Antissoro e anticorpo de coelho anti-IgG equino

Segundo técnica descrita por Bollag et. al. (1996) foi utilizado 1mg de IgG equino purificado em 1ml de adjuvante completo de Freund e inoculado por via intramuscular em coelho. Foram realizadas mais quatro aplicações semanais com a mesma concentração proteica em adjuvante incompleto de Freund, alternando as vias de administração subcutânea e intramuscular.

Após dez dias da última aplicação foi realizada a colheita de sangue para obtenção de soro e verificado a reatividade, do mesmo contra a IgG equina purificada por meio da imunodifusão dupla em gel de ágar. Em seguida foi realizado a eutanásia e sangria total do coelho para obtenção do antissoro.

³² SB 190. CELM Cia. São Caetano do Sul, São Paulo.

³³ PROTEINAS TOTAIS Katal® - Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda. Belo horizonte, Minas Gerais.

³⁴ ALBUMINA Katal® - Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda. Belo horizonte, Minas Gerais.

³⁵ GE Healthcare Bio-Sciences AB - Björkgatan 30 751 84, Uppsala, Sweden.

Uma alíquota do antissoro foi submetida ao mesmo procedimento de purificação de IgG descrito anteriormente. Porém, foi utilizada uma coluna de proteína A, pois esta tem mais afinidade à IgG de coelho que a coluna de proteína G, segundo o fabricante.

Sistema S-ELISA

Para determinar a concentração de IgG das amostras de colostro, soro e plasma foi utilizada técnica descrita por Erhard e colaboradores (2001) com modificações. Foi utilizado anticorpo de coelho anti-IgG equino como captura na concentração de $0,5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ diluído em Tampão Carbonato Bicarbonato (TCB) $0,05\text{M}$ pH 9,6 num volume de $100\mu\text{L}$ /poço em microplacas de poliestireno³⁶. Em seguida, a microplaca foi incubada a 37°C em câmara úmida durante 60 minutos.

Após a adsorção do anticorpo de captura, a microplaca foi lavada cinco vezes com PBS pH 7,4 com 0,05% de Tween 20 (PBST), todas as posteriores lavagens da microplaca seguiram o mesmo protocolo. Após lavagem, realizou-se a etapa de bloqueio de “ruídos” pela adição de $300\mu\text{L}$ poço de TCB pH 9,6 + 10% Leite em Pó Desnatado (LPD). Após, foi realizada incubação em câmara úmida por 45 minutos a 37°C , em seguida foi realizada nova etapa de lavagem da microplaca com PBST.

As amostras teste e padrão de referência foram diluídas com PBST + 10% de LPD. As amostras de soro de potros do M1 foram diluídas a 2×10^3 , já as amostras de soro e plasma foram diluídas 4×10^4 e de colostro 8×10^4 . Para cada microplaca foi construída uma curva padrão utilizando IgG equino purificado nas concentrações que variaram de $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $0,015\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Posteriormente, foi adicionado $100\mu\text{L}$ /poço das amostras de soro teste e padrão e efetuada incubação da microplaca em câmara úmida a 37°C por 60 minutos.

Após incubação foi realizada lavagem da microplaca e adicionado $100\mu\text{L}$ /poço do conjugado Imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG de equino conjugado com peroxidase³⁷ preparado na diluição 4×10^3 com PBST e 10% de LPD. Essa fase foi incubada durante 60 minutos a 37°C em câmara úmida. Depois, a microplaca foi lavada, em seguida adicionado $100\mu\text{L}$ /poço do substrato cromogênico ($2,5\mu\text{L}$ de H_2O_2 a 30% + $100\mu\text{L}$ de Tetrametilbenzidina-TMB a 10 mg/mL em Dimetilsulfóxido-DMSO + 10 mL do Tampão Citrato Acetato $0,1\text{ mol/L}$ pH 6,0) em toda a microplaca. A mesma foi mantida sob agitação constante durante 15 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. A reação colorimétrica foi bloqueada com a solução de HCl 2 mol/L no volume de $50\mu\text{L}$ /poço e a leitura da Densidade Óptica (DO) foi realizada em leitora automática³⁸ em um comprimento de onda de 450 nm contra um branco onde foi colocado apenas o bloqueio, o substrato com cromógeno e o bloqueador da reação colorimétrica. Como controle da reação foi utilizado, em cada microplaca, poços sem amostra, e considerados como satisfatório quando estes apresentaram DO semelhante ao branco.

As DO obtidas, em cada curva padrão, e as respectivas concentrações foram correlacionadas através de regressão polinomial de grau 2 e utilizado a equação quadrática para determinação da concentração de IgG das amostras. Posteriormente foi multiplicado os valores obtidos pelo fator de diluição de cada amostra. Foram admitidas as reações com curvas que apresentaram coeficiente de variação (CV) $<10\%$ nas duplicatas e com $R^2>0,95$. Todas as amostras foram testadas em triplicatas e consideradas as que tiveram $\text{CV}<10\%$, as que apresentaram concentrações superiores a curva padrão foram diluídas e multiplicadas pelo fator de diluição correspondente.

Teste de repetibilidade S-ELISA

Foi avaliado a repetibilidade intra e inter-teste, dos resultados do sistema S-ELISA, tanto do IgG equino purificado (utilizado como padrão) quanto das amostras de soro e colostro testadas. Para tal, foi avaliado o coeficiente de variação (CV) das DO's das amostras teste e padrão de referência, em duplicatas, dentro de uma mesma microplaca (intra-teste) e o CV das DO's das mesmas amostras em diferentes microplacas (inter-teste) (OIE, 2014).

Foram realizadas cinco diluições seriadas do IgG equino padrão (de $01\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ até $0,015\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e distribuídas, em duplicatas, em cinco pontos diferentes de uma mesma microplaca. A mesma diluição seriada foi avaliada em cinco microplacas diferentes, sendo que cada teste foi realizado em diferentes dias. Também foram escolhidas, aleatoriamente, dez amostras teste (cinco de soro e cinco de colostro) e testadas, em duplicata, em diluições ótimas, em quatro pontos distintos de uma mesma microplaca, o procedimento foi realizado três vezes em diferentes dias.

³⁶ Nunc™ Medisorp - Thermo Fisher Scientific Inc.

³⁷ A6917 SIGMA® - Sigma-Aldrich Brasil Ltda. São Paulo, São Paulo.

³⁸ Multiskan EX - Labsystems - Thermo Fisher Scientific Inc.

Para verificar a exatidão do teste incluiu-se uma amostra com concentração conhecida como controle positivo. Todas as diluições, tanto do IgG padrão quanto das amostras teste foram realizadas de forma independente para cada ponto da microplaca.

Análise do colostro

O colostro das éguas PSI foi avaliado imediatamente após o parto, antes dos potros mamarem, com um colostrômetro de refração BRIX³⁹ (CASH, 1999).

Em laboratório foi utilizado um colostrômetro de densidade específica⁴⁰ sugerido por Leblanc e colaboradores (1986). Posteriormente, foi realizada a centrifugação das amostras a 8000 G durante 15 minutos a 4°C para separação da fração lipídica e proteica do soro que foi armazenado para quantificação de IgG total.

Análise estatística

Foi realizada estatística descritiva (média, desvio padrão) dos dados clínicos e etológicos dos potros e éguas. Todas as variáveis quantitativas foram testadas quanto à normalidade e homocedasticidade dos dados.

Um modelo linear misto (PROC MIXED - SAS® University Edition) foi utilizado para comparar a diferença dos valores de PT dos potros, por diferentes testes, entre os cinco momentos e a concentração de IgG do grupo de potros obtidos nos cinco momentos. Demais variáveis quantitativas nos cinco momentos do grupo de potros foram submetidas a ANOVA de medidas repetidas e Tukey como teste a posteriori. Para comparação dos valores médios das variáveis quantitativas entre potros e éguas foi utilizado ANOVA-One Way e teste de múltiplas comparações de Tukey.

Para variável não paramétrica a comparação de medianas dependentes e independentes foram utilizados os testes de Friedman e Kruskal Wallis, respectivamente, seguidos do teste de múltiplas comparações de Dunn. Foi utilizado coeficiente de correlação de Pearson para as seguintes correlações: Entre concentrações obtidas por diferentes métodos para PT do grupo de potros nos cinco momentos; entre concentrações de PT (ambos os métodos), gamaglobulina, globulina total e concentração de IgG total; entre concentração de IgG sérico e colostrado das éguas; entre densidade (dois métodos) e concentração de IgG colostrado; entre concentração de IgG colostrado e IgG sérico dos potros. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares computacionais SAS® University Edition e GraphPad Prism® 5.01 e consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados etológicos dos potros aqui descritos estão de acordo com os já observados por outros autores em indivíduos da mesma raça e com padrão de manejo semelhante aos animais deste estudo (KURTZ FILHO, M. et al., 1997). A mediana (mínimo/máximo) para frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal do grupo de potros, nos cinco momentos, estão descritos no Quadro 1. A frequência cardíaca dos potros não diferiu estatisticamente de M1 até M4, diminuindo estatisticamente em M5. A frequência respiratória se manteve acima dos 60 movimentos por minuto até M4, diminuindo significativamente em M5 quando comparado com M3. Já a temperatura retal teve aumento significativo de M1 a M2, não diferindo nos demais momentos quando comparado a M2. Os parâmetros vitais dos potros (frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal) em todos os momentos de avaliação se mantiveram dentro da variação normal. É considerado como ideal tempo de gestação de, pelo menos, 320 dias de gestação para completa maturação fetal (PARADIS, 2006). Dois dos potros inclusos nesta pesquisa nasceram com menos de 320 dias de gestação, mas nenhum apresentou sinais clínicos de mal ajustamento ou tiveram FTIP.

Proteína Total, Albumina e Globulinas Totais

Houve forte correlação entre os resultados obtidos nas duas técnicas de avaliação da PT sérica dos potros (nos cinco momentos) (Figura 1). As médias \pm desvio padrão da PT (ambos os métodos de análise), albumina e globulina total estão dispostos no Quadro 2.

³⁹ ARS Equine Colostrum Refractometer. Animal Reproduction Systems, Inc. Califórnia, USA.

⁴⁰ JorVet Equine Colostrometer. Jorgensen Laboratories Inc. Colorado, USA.

Na análise de variância utilizando o modelo linear misto, onde o tipo de teste para PT foi considerado efeito fixo, não foi observado diferença estatística entre os valores de PT sérica dos potros em nenhum dos momentos ($P > 0,05$). Foi observado melhor correlação entre os valores de PT sérica estimada por refratômetro manual e IgG do que PT estimada pela técnica de Biureto (Figura 2). Os refratômetros manuais são amplamente utilizados para determinação de PT em amostras de fluidos corpóreos pela facilidade e rapidez no resultado, entretanto, devido dependência da transmissão de luz é necessário que as amostras de soro ou plasma estejam limpas de coágulos, lipemia ou hemólise (KANEKO et al., 2008).

A albumina dos potros ao nascimento correspondeu a mais de 50% da PT, estava dentro dos valores considerados como normal (KANEKO et al., 2008). Todavia, estava acima dos valores encontrados na literatura, em potros com menos de uma semana de vida atendidos em unidade hospitalar (WONG et al., 2013), o que pode ser atribuída ao fato da albumina ser considerada uma proteína de fase aguda negativa e pode diminuir rapidamente frente a processos infecciosos ou inflamatórios (KANEKO et al., 2008), e neste trabalho todos os potros estavam hígidos.

Os níveis séricos da PT das éguas no momento do parto estavam de acordo com os valores de referência relatados pela literatura (KANEKO et al., 2008; RIOND et al., 2009). Já albumina sérica das éguas se encontrava acima dos descritos por Di Filippo et al (2010) e Riond et al (2009b), o que é interessante, uma vez que os níveis séricos de Albumina tendem a diminuir na fase final da gestação (KANEKO et al., 2008).

As globulinas totais são compostas pelas frações alfa, beta e gamaglobulinas, estas são compostas pelas imunoglobulinas IgA, IgM, IgE e IgG (KANEKO, 2008) e estão em quantidades muito pequenas nos potros ao nascer, aumentando nas primeiras horas de vida após ingerir colostro (JEFFCOTT, 1974; FOUCHÉ et al., 2014). No presente estudo a globulina total sérica, dos cinco momentos foi altamente correlacionada com proteína total ($r=0,94$ e $P < 0,0001$), aumentou significativamente ($P < 0,05$) do nascimento até as 10 horas de vida, mantendo-se em níveis semelhantes aos adultos até os trinta dias de vida e acima de valores encontrados na literatura (HURCOMBE et al., 2012). Porém, com fraca correlação com os valores de (Figura 3).

Alguns autores sugerem o monitoramento da FTIP através da avaliação de PT e globulinas totais sérica (METZGER et al., 2006) e embora alguns trabalhos tenham encontrado melhor relação entre estas e a concentração de gamaglobulinas e de IgG sérico em potros (HURCOMBE et al., 2012; FOUCHÉ et al., 2014) não é aconselhável utilizá-las rotineiramente para diagnóstico de FTIP, pois os resultados podem ser insidiosos e ocasionar a perda de potros por doenças devido resultados falso-negativos ou gastos dispendiosos por resultados falso-positivos (DAVIS; GIGUERE, 2005).

Proteinograma (Eletroforese em gel de agarose)

A Figura 4 demonstra o resultado da leitura, das amostras de soro de um potro no M1 e M2 submetida a eletroforese em gel de agarose, onde é possível verificar a virtual ausência da fração gamaglobulina, pois o potro ainda não havia mamado o colostro.

As medidas de tendência central e dispersão das concentrações séricas de PT e frações proteicas do grupo de potros (nos cinco momentos) e suas progenitoras (imediatamente após o parto) estão descritos no Quadro 3.

Já foi observado que as frações α e β -globulinas são compostas por proteínas de fase aguda, e se elevam rapidamente em situações inflamatórias ou infecciosas (KANEKO et al., 2008; FAVERO et al., 2011). Equinos com problemas infecciosos (doenças gastrointestinais) e inflamatórios (problemas locomotores) possuem níveis séricos maiores das subfrações $\alpha 1$ e β -globulinas quando comparados a grupo de animais hígidos (VICTORIA CARAPETO et al., 2006). No presente estudo foi observado que as frações α -globulinas permaneceram em níveis constantes de M1 a M4 (nascimento até 24-48 horas de vida), sendo que a fração $\alpha 1$ aumentou de forma significativa de M3 a M4, ou seja, 24 horas após administração do plasma.

A fração β -globulina aumentou de forma significativa de M1 a M2 ($P < 0,05$), e teve um aumento bastante significativo ($P < 0,0001$) de M3 a M4 (após os potros receberem o plasma) e no M5 quando comparado ao M3 ($P < 0,0001$). As frações alfa e beta globulinas detectadas através de eletroforese compreendem uma série de proteínas de fase aguda (proteína C reativa, hemopexina, transferrina, fibrinogênio e amiloide A) que aumentam rapidamente frente processos inflamatórios diversos (MURATA et al., 2004; KANEKO et al., 2008), podendo algumas serem secretadas no colostro e leite de éguas (MCDONALD et al., 2001; DUGGAN et al., 2008). O perfil eletroforético de proteínas de fase aguda são utilizados para diagnóstico de sepse em potros, sabe-se que em potros septicêmicos

ocorre uma diminuição significativa de Amiloide A em processos agudos, aumentando com a cronicidade da doença (PALTRINIERI et al., 2008; JACOBSEN; ANDERSEN, 2010).

A fração gamaglobulina é composta pelas imunoglobulinas IgA, IgM, IgE e IgG (KANEKO, 2008), sendo esta última a imunoglobulina mais abundante (TIZARD, 2004). Estão em quantidades muito pequenas nos potros ao nascer, aumentando nas primeiras horas de vida após ingerir colostro até atingir o pico de absorção entre 18 e 24 horas (JEFFCOTT, 1974). No presente estudo a fração γ -globulina estava abaixo de 100mg/dL ao nascimento aumentando significativamente ($P<0,0001$) com 10 horas de vida, sugerindo que o pico de absorção de imunoglobulinas, contidas na fração gama, pode ocorrer até as dez horas de vida, mais cedo do que os resultados observados em trabalhos anteriores (JEFFCOTT, 1974; ERHARD et al., 2001; LANG et al., 2007).

Aos trinta dias a concentração sérica de gamaglobulina diminuiu significativamente ($P<0,05$) devido o tempo de meia vida das principais imunoglobulinas ser de aproximadamente 30 dias (SHEORAN et al., 2000). Todavia, em M5 a concentração média da fração gamaglobulina dos potros ainda estava em níveis considerados como suficientes para promover proteção contra agentes infecciosos (JEFFCOTT, 1974; KOHN et al., 1989).

A correlação positiva entre as concentrações séricas de proteína total determinada por ambos os métodos ($r^2=0,66$ por refratometria e $r^2=0,87$ por bioquímico) e fração gamaglobulina dos potros com 10 horas de vida (M2) sugere que a aferição da PT pode ser utilizada para estimar a concentração de gamaglobulinas e identificar possíveis casos de FTIP na propriedade, pois refratômetros manuais são de simples operação e baixo custo. Tais observações corroboram com resultados relatados por Korosue e colaboradores (2012), onde afirmam que a diferença da concentração da proteína total antes e após potros mamarem colostro pode ser utilizado como teste de triagem para FTIP.

Além da proteína total e albumina as frações proteicas que diferiram estatisticamente antes e após a administração do plasma foram $\alpha 1$ e β -globulinas. Todavia, não podemos atribuir esta diferença ao tratamento com plasma, uma vez que não foi possível utilizar um grupo controle por questões intrínsecas ao manejo da propriedade, pois o risco aos animais não justificaria esta utilização.

Determinação IgG total

Seguindo as técnicas descritas por Bollag e colaboradores (1996) foi verificada a pureza da IgG equina e anticorpo de coelho anti-IgG equino pela detecção das cadeias leve e pesadas (25 e 50 KDa, respectivamente) através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% (Figura 5). Após, foi avaliado a concentração proteica destes anticorpos, através da técnica de BCA, onde foi utilizado uma curva padrão (Figura 6) com base em concentrações conhecidas de IgG humana.

No teste de repetibilidade do sistema de S-ELISA foram observados que os coeficientes de variação (CV) intra e inter-teste das curvas padrão foram $CV<9,5\%$ e $CV<11,6\%$, respectivamente, com limites de detecção de 62ng/ml a 1000ng/ml. Já o CV intra e inter-teste das amostras avaliadas foram $CV<9,7\%$ e $CV< 15,7\%$, respectivamente. A concentração média estimada para amostra controle (800mg/dL) em seis corridas diferentes foi de 796 ± 181 mg/dL o que corresponde a uma precisão de 96%. Estes resultados sugerem uma boa acurácia, tendo em vista a repetibilidade e precisão do teste (GREINER; GARDNER, 2000; OIE, 2014).

Além da acurácia, outro aspecto interessante do sistema de S-ELISA, aqui demonstrado, foi a facilidade e rapidez dos resultados obtidos, pois da primeira fase (sensibilização da microplaca) até a leitura das placas foram de aproximadamente cinco horas, sendo mais rápido que o teste proposto por Erhard e colaboradores (2001) e teste de IDRS, onde há a necessidade de 24 horas de difusão para se realizar as leituras (LEBLANC et al., 1986; KOHN et al., 1989; MCCLURE et al., 2001; RAIDAL et al., 2005; LANG et al., 2007).

Estão dispostos no Quadro 4 as médias e desvios padrão das concentrações de IgG séricas de potros e éguas. A média e desvio padrão da concentração de IgG total das amostras de plasma (utilizado nos potros em M3), foi de 2.026 ± 148 mg/dL.

Não houve diferença significativa ($P<0,05$) quando comparados os níveis de IgG sérico dos potros às 10, 24 e 48 horas de vida. No M2 (10 horas) os potros apresentavam níveis séricos de IgG maiores ($P<0,01$) que o das éguas progenitoras no momento do parto e do plasma utilizado. Assim consideramos que, com 10 horas de vida, os potros já se encontravam no pico de absorção de IgG, nas condições de manejo adotado pela propriedade monitorada.

Nas condições aqui avaliadas, o teste Imunoenzimático rápido (SNAP teste) para detecção semiquantitativa de IgG utilizado a campo foi eficaz e o tempo de 10 horas de vida para avaliação se

mostrou adequado. Embora não seja objetivo aqui avaliar o SNAP teste, estes resultados corroboram com avaliações feitas por outros pesquisadores anteriormente (MCCLURE et al., 2003; DAVIS; GIGUERE, 2005). Com a detecção precoce de FTIP é possível adotar medidas de suplementação de imunoglobulinas, tanto por colostro (banco de colostro) quanto por substitutos (FRANZ et al., 1998; HAMMER et al., 2000), aproveitando melhor capacidade de absorção pelos potros.

A concentração de IgG do grupo de potros não diferiu significativamente entre 24-48 horas de vida (intervalo em que foi administrado um litro de plasma hiperimune). Aos 30 dias de vida houve uma diminuição significativa da concentração de IgG em todos os potros, o que era esperado já que o tempo de absorção é limitado, os níveis de IgG colostrais diminuem significativamente nas primeiras 24 horas pós-parto e existe um consumo e catabolismo dessas imunoglobulinas no processo de defesa contra antígenos ambientais (JEFFCOTT, 1974; CSAPÓ-KISS et al., 1995; FLAMINIO et al., 2000; RAIDAL et al., 2005). Todavia, aos trinta dias a média do grupo para a concentração de IgG foi quase o dobro do que é considerado como ideal (KOHN et al., 1989; MCCLURE et al., 2001).

Quando comparamos os resultados obtidos pelo S-ELISA com outros trabalhos (ERHARD, M H et al., 2001; SEDLINSKÁ et al., 2006), observamos que a concentração de IgG sérica dos potros, aqui avaliados, de M1 a M3 foram maiores e em M5 foram semelhantes aos relatados por estes pesquisadores. Já a concentração de IgG sérico das éguas foi semelhante e o colostrado foi superior aos dados da literatura supracitada. Entretanto, em nenhum destes trabalhos os autores relataram se as éguas progenitoras foram submetidas à algum tipo de protocolo vacinal na fase final de gestação, isto pode influenciar de forma significativa na concentração de imunoglobulinas séricas e colostrais das éguas e consequentemente na concentração sérica dos potros (CAUCHARD et al., 2004; MARTINS et al., 2010). Já foi evidenciado que potros hípidos nascidos de éguas vacinadas possuíam níveis de IgG séricos tão altos quanto os observados neste estudo (FLAMINIO et al., 1999).

Houve forte correlação entre concentração da fração γ -globulina e concentração de IgG dos potros, nos cinco momentos ($r=0,85$; $P<0,05$; Figura 7), corroborando com os valores relatados na literatura (HURCOMBE et al., 2012; FOUCHÉ et al., 2014). Porém, em 62% (62/100) das amostras, aqui analisadas, a fração γ -globulina foi menor que os valores encontrados para a concentração de IgG. Um fator deletério da técnica de eletroforese em gel de agarose é que devido a impurezas na agarose a eletroendosse leva a uma quantidade da fração γ -globulina migrar em direção ao cátodo (KANEKO et al., 2008) isto pode ter influenciado na leitura e consequentemente subquantificação desta fração.

Densidade e concentração de IgG colostrado

A média e desvio padrão da densidade específica, índice BRIX e concentração de IgG colostrado determinada por S-ELISA estão dispostos no Quadro 5.

Não foi encontrada correlação entre a concentração de IgG sérica e colostrado das éguas, corroborando com resultados observados por Kohn e colaboradores (1989). Houve fraca correlação positiva ($r=0,44$ e $P>0,05$) entre a densidade específica e índice BRIX do colostro no momento do parto (Figura 8).

Foi observada fraca, no entanto idêntica, correlação positiva ($r=0,47$; $P<0,05$) entre concentração de IgG determinado por S-ELISA e a densidade avaliada pelos dois tipos de colostrômetro (Figura 9) ao contrário do observado por Korosue et al. (2012) que obtiveram correlação negativa entre índice BRIX e concentração de IgG de colostro de éguas.

Fatores como temperatura ambiente (Leblanc et al., 1986) e amostras com concentrações abaixo de 5000 mg/dL de IgG (WAELCHLI et al., 1990) influenciam na densidade colostrado. Outro fator a ser levado em consideração é a idade das éguas aqui avaliadas que variou de 8 a 24 anos, além do tempo de gestação e número de partos que variaram de 316 a 355 dias e de 1 a 12 partos, respectivamente. Isto pode ter influenciado na correlação entre densidade específica e concentração de IgG, uma vez que ambas variáveis mudam conforme idade, número de partos, tempo de gestação e raça (WAELCHLI et al., 1990; LEBLANC et al., 1992).

Já foi demonstrado que potros saudáveis absorvem até 50% da IgG colostrado nas primeiras 12 horas de vida (RAIDAL et al., 2005). Todavia, aqui observamos fraca correlação ($r=0,46$ e $p<0,05$) entre a concentração de IgG colostrado no momento do parto e a concentração de IgG sérica dos potros, com 10 horas de vida, corroborando com os achados de Erhard et al. (2001).

CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo foi possível determinar com o teste de ELISA proposto concentrações de IgG em amostras de soro, plasma e colostro equino com uma boa repetibilidade e a capacidade de mensurar ampla variação de concentrações dentro de um mesmo teste.

A proteína total e globulinas totais se mostraram fracas indicadoras da concentração de IgG em amostras de soro de potros hígidos. Todavia, a proteína total estimada por refratômetro manual teve melhor correlação com a concentração de IgG destas amostras. Também foi possível verificar que as concentrações séricas de algumas frações proteicas de potros hígidos não dependem do colostro, pois já estavam em níveis semelhantes a animais adultos desde o nascimento, antes da primeira mamada.

O colostrômetro de refração (índice BRIX) se mostrou melhor indicador da concentração de IgG em amostras de colostro colhidas imediatamente após o parto do que o colostrômetro de densidade específica utilizando as mesmas amostras após o congelamento.

AGRADECIMENTO

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão de uma bolsa de mestrado, processo nº 2014/13328-7.

QUADROS

QUADRO 1 - Mediana (mínimo/máximo) das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) e temperatura retal (TR) de potros da raça puro sangue inglês, em cinco momentos, do nascimento aos 30 dias de vida (n=20).

Momento	FC (bpm)	FR (mpm)	TR °C
M1	88 (60/116) ^a	62 (40/80) ^a	37,8 (37,4/38,5) ^a
M2	100 (84/108) ^a	72 (40/80) ^a	38,5 (38/38,9) ^b
M3	100 (84/112) ^a	68 (44/80) ^a	38,5 (38,2/39,3) ^b
M4	101 (84/106) ^a	64 (36/80) ^{ab}	38,5 (38/39) ^b
M5	80 (64/100) ^b	48 (36/80) ^b	38,3 (37,8/39) ^b

- Medidas seguidas por letras sobrescritas iguais nas colunas não diferem entre si ($P>0,05$)
 - M1= logo após o parto, previamente mamar colostro; M2= dez horas de vida; M3= 24-36 horas de vida, previamente transfusão plasma hiperimune; M4= 24 horas após administração do plasma hiperimune; M5= 30 dias de vida; bpm = batimentos por minuto; mpm = movimentos por minuto.

QUADRO 2 - Média \pm desvio padrão da Proteína Total (dois métodos), Albumina e Globulinas Totais dos potros (n=20), nos cinco momentos, e éguas (n=20) no momento do parto.

Proteínas (mg/dL)	Momentos					Éguas	
	M1	M2	M3	M4	M5		
PT (refratômetro)	\bar{X}	4.350 ^{ab}	6.080 ^{bcB}	5.890 ^{bB}	6.370 ^{cB}	5.970 ^{bB}	7.140 ^A
	\pm	252	839	771	585	343	535
PT (bioquímico)	\bar{X}	4.095 ^{aB}	6.340 ^{bB}	6.095 ^{bB}	6.799 ^{cA}	5.959 ^{aB}	7.326 ^A
	\pm	283	961	823	712	470	588
Albumina (bioquímico)	\bar{X}	2.950 ^{aB}	2.767 ^{bB}	2.712 ^{bB}	2.735 ^{bB}	2.867 ^{abB}	3.555 ^A
	\pm	268	253	282	314	193	251
Globulina total	\bar{X}	1.874 ^{aB}	3.493 ^{bA}	3.672 ^{bA}	3.669 ^{bA}	3.092 ^{bA}	3.772 ^A
	\pm	1.251	1.011	944	717	427	566

M1= logo após o parto, previamente mamar colostro; M2= dez horas de vida; M3= 24 horas de vida, previamente transfusão plasma hiperimune; M4= 48 horas de vida; M5= 30 dias de vida. Médias com letras iguais nas linhas demonstram semelhança estatística entre as médias ($P\leq 0,05$).

QUADRO 3 - Medidas de tendência central e dispersão da proteína total (PT) obtida através de analisador bioquímico e das frações proteicas - Alb. (albumina), α 1 (alfa1-globulina), α 2 (alfa2-globulina), β (beta-globulina) e γ (gamaglobulina) - dos potros (n=20) nos cinco momentos e éguas progenitoras (n=20) no momento do parto.

Proteínas (mg/dL)		Potros (n=20)					Éguas (n=20)
		M1	M2	M3	M4	M5	
PT	\bar{X}	4.095 ^{aB}	6.340 ^{bB}	6.095 ^{bB}	6.799 ^{cA}	5.959 ^{aB}	7.326 ^A
	\pm	283	961	823	712	470	588
Alb.	\bar{X}	2.617 ^{aB}	2.925 ^{bcB}	2.799 ^{bB}	3006 ^{cB}	2.589 ^{aB}	3.659 ^A
	\pm	358	332	377	267	241	335
α 1	\bar{X}	377 ^{aA}	400 ^{abA}	391 ^{aA}	454 ^{bA}	586 ^{cB}	411 ^A
	\pm	82	104	78	116	118	98
α 2	\bar{X}	368 ^{aA}	371 ^{aA}	338 ^{aA}	367 ^{aA}	456 ^{bA}	421 ^A
	\pm	79	98	132	89	64	70
β *	Mediana	660 ^{aB}	780 ^{bB}	775 ^{abB}	1.055 ^{cdA}	1.325 ^{dA}	1.215 ^A
	Min/Máx	250/750	550/1.390	490/1.000	720/1.290	920/1.720	850/1.900
γ	\bar{X}	84 ^{aB}	1.816 ^{bA}	1.805 ^{bA}	1.911 ^{bA}	991 ^{cB}	1.580 ^A
	\pm	59	572	463	451	330	330

- * Variável considerada não paramétrica - valores de tendência central representados por mediana e de dispersão representados por mínimo e máximo.

- M1= logo após o parto, previamente mamar colostro; M2= dez horas de vida; M3= 24-36 horas de vida, previamente transfusão plasma hiperimune; M4= 24 horas após administração do plasma hiperimune; M5= 30 dias de vida.

- Letras sobrescritas minúsculas iguais indicam médias semelhantes ($P < 0,05$) entre os cinco momentos do grupo de potros e subscritas maiúsculas iguais indicam médias semelhantes ($P < 0,05$) entre grupo de éguas com cada um dos momentos dos potros.

QUADRO 4 - Média \pm desvio padrão das concentrações de IgG sérico de potros em cinco momentos e suas respectivas mães no momento do parto, obtidos através da técnica de S-ELISA.

Grupo	Amostra	Momentos	IgG (mg/dL)
S-ELISA			
Potro	Soro	M1	15 \pm 8 ^a
Potro	Soro	M2	2.408 \pm 628 ^b
Potro	Soro	M3	2.282 \pm 783 ^{bd}
Potro	Soro	M4	2.364 \pm 784 ^b
Potro	Soro	M5	1.414 \pm 586 ^c
Égua	Soro	Parto	1.746 \pm 505 ^{cd}

^{a-e} Amostras com médias iguais não se diferem estatisticamente dentro de cada tipo de teste ($P < 0,05$).

M1= logo após o parto, previamente mamar colostro; M2= dez horas de vida; M3= 24 horas de vida, previamente transfusão plasma hiperimune; M4= 48 horas de vida; M5= 30 dias de vida.

QUADRO 5 - Média \pm Desvio Padrão da densidade específica, índice BRIX e concentração de IgG, estimado por S-ELISA, de amostras de colostro de éguas colhidas imediatamente após o parto, antes da primeira mamada dos potros (n=20).

	Densidade específica	Índice BRIX %	IgG (mg/dL)
			S-ELISA
\bar{X}	1.080	28,05	7714
\pm	0.017	2,72	2619

FIGURAS

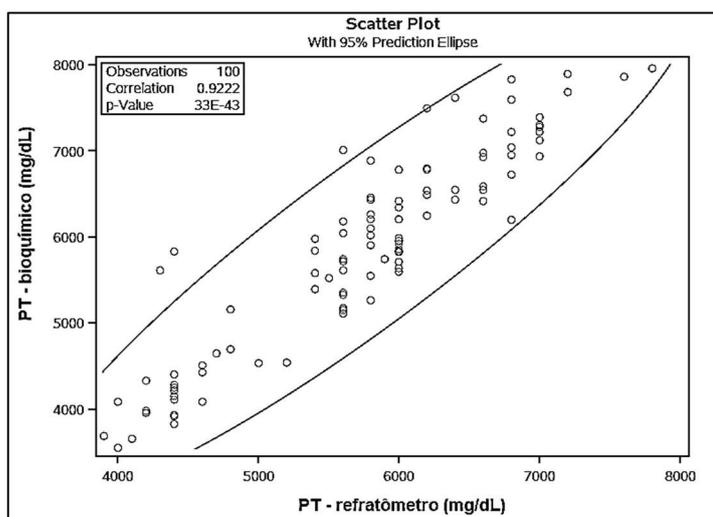


FIGURA 1 - Representação gráfica da forte correlação positiva entre os valores de PT obtidos através de refratômetro manual e analisador bioquímico com coeficiente de correlação de Pearson 0,92 e $P < 0,0001$.

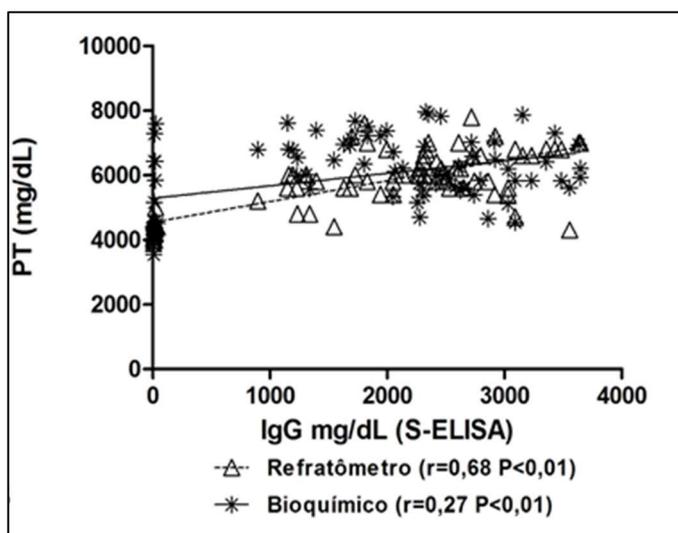


FIGURA 2 - Representação gráfica da relação entre concentração sérica de proteína total (PT), obtidas em analisador bioquímico e refratômetro, e IgG sérico pela técnica de S-ELISA nos cinco momentos de avaliação do grupo de potros ($P < 0,01$).

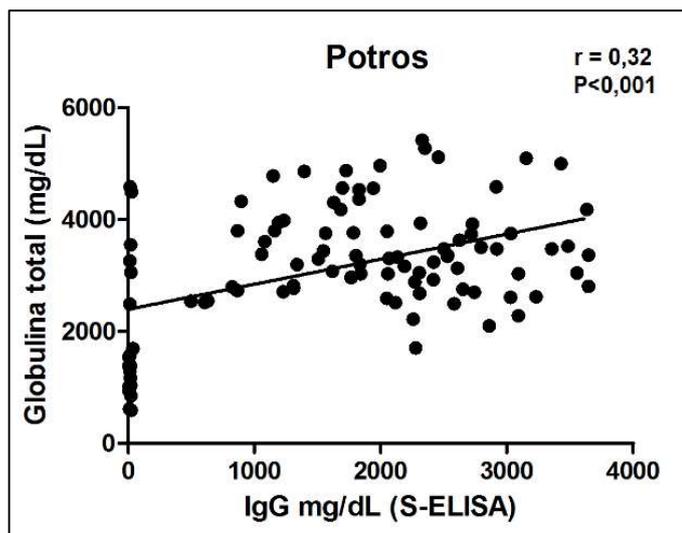


Figura 3 - Representação gráfica da correlação entre concentração de globulina total e IgG sérico pela técnica de S-ELISA nos cinco momentos de avaliação dos potros.

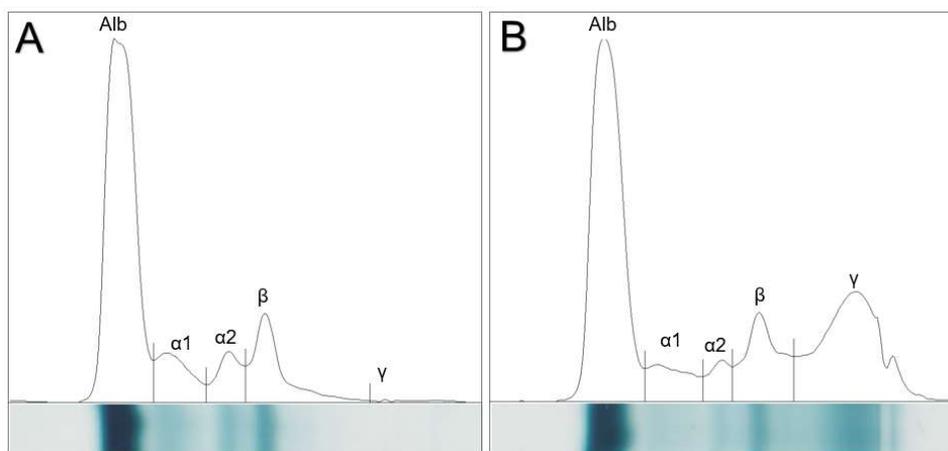


FIGURA 4 - Configuração do laudo de leitura das frações proteicas séricas de um potro clinicamente saudável no M1 (A) e M2 (B). Os picos representam, da esquerda para a direita, as bandas albumina, $\alpha 1$, $\alpha 2$, β e γ -globulinas no gel de agarose. Notar a fração gamaglobulina virtualmente inexistente em M1 (A) onde o potro ainda não havia mamado o colostro.

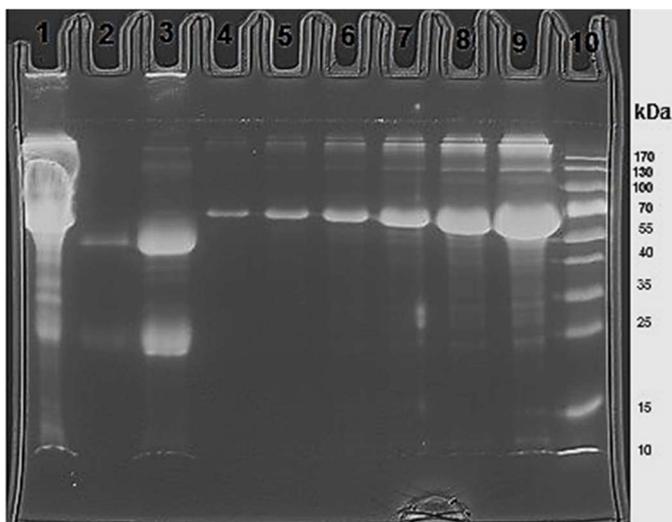


FIGURA 5 - Eletroforese SDS-PAGE 12,5%: Caracterização de imunoglobulina G a partir da identificação de suas cadeias leve e pesada, 25 KDa e 50 KDa respectivamente. Colunas 2 e 3 - amostras IgG equina e IgG de coelho anti-equina, respectivamente; colunas 4 a 9 - soro albumina bovina; Coluna 10 - padrão de peso molecular.

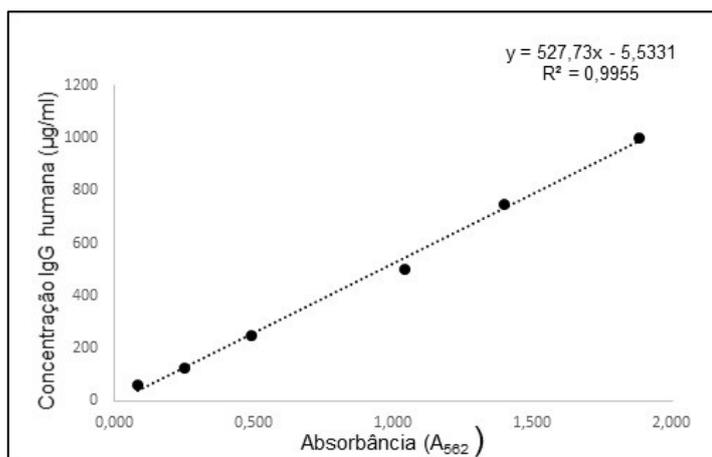


FIGURA 6 - Correlação entre concentrações de IgG humana (1 $\mu\text{g/ml}$; 0,75 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 0,125 $\mu\text{g/ml}$; 0,062 $\mu\text{g/ml}$) e seus respectivos valores de absorvância, obtidos pela técnica de BCA, utilizados para análise de regressão linear e construção da equação da reta padrão, para determinação das concentrações relativas de IgG equina e IgG de coelho anti-IgG equino.

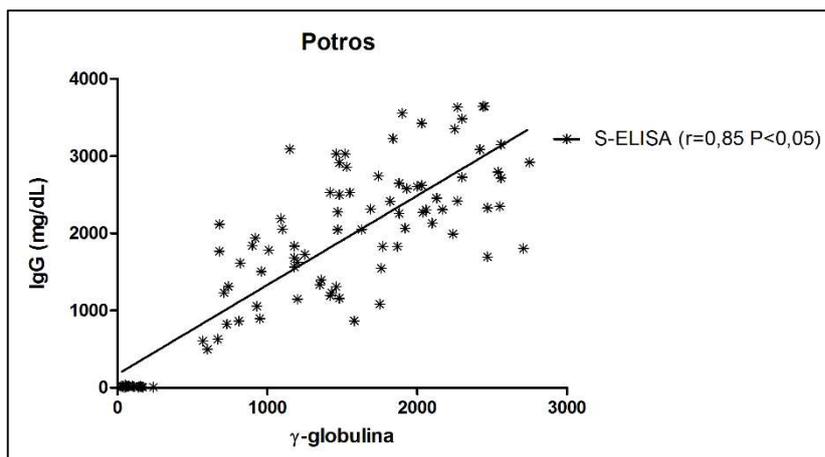


FIGURA 7 - Representação gráfica da correlação entre concentração da fração γ -globulina e IgG sérico pela técnica de IDRS e S-ELISA nos cinco momentos de avaliação dos potros.

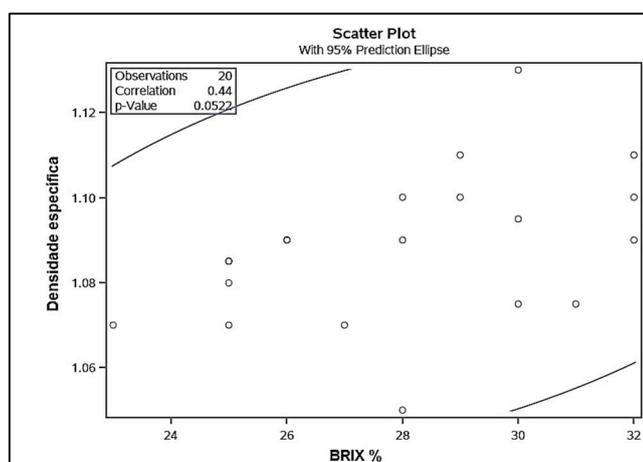


FIGURA 8 - Representação gráfica da correlação entre a densidade das amostras de colostro avaliado colostrômetro portátil de índice BRIX e colostrômetro de densidade específica ($r=0,45$ e $P<0,05$).

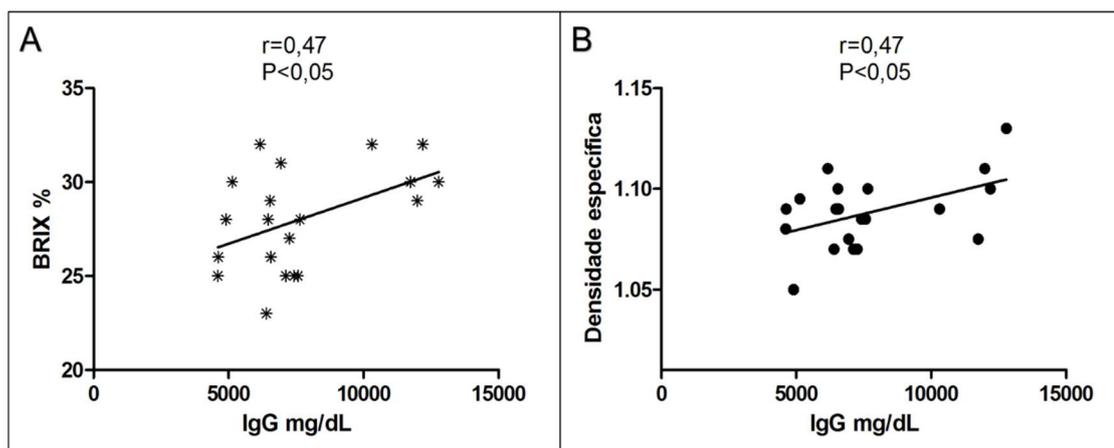


FIGURA 9 - Representação gráfica da correlação entre concentração de IgG e densidade colostrál, avaliada por colostrômetro portátil de índice BRIX das amostras imediatamente após o parto (A) e densidade específica das amostras congeladas (B).

REFERÊNCIAS

- LANG, A.; SOUZA, M. V.; SALCEDO, J. H. P.; SOSSAI, S.; ARAÚJO, R. R.; LOURENÇO, G. G.; MAIA, L. IMUNIDADE PASSIVA EM EQUINOS: COMPARAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE IgG DO SORO MATERNO, COLOSTRO E SORO DO NEONATO. **Revista Ceres**, v. 54, n. 315, p. 405-411, 2007. Disponível em: <<http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/3256>>.
- BOLLAG, D.M; ROZYCKI, M.D.; EDELSTEIN, S. J. **Protein Methods, 2nd Edition**. 1996.
- CASTON, S. S.; MCLURE, S. R.; MARTENS, R. J.; et al. Effects of Hyperimmune Plasma on the Severity of Pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in Experimentally Infected Foals. **Veterinary Therapeutics**, v. 7, n. 4, p. 361-375, 2006.
- CLABOUGH, D. L.; LEVINE, J. F.; GRANT, G. L.; CONBOY, H. S. Factors associated with failure of passive transfer of colostral antibodies in Standardbred foals. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, n. 6, p. 335-40, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1779427>>.
- CSAPÓ-KISS, Z.; STEFLER, J.; MARTIN, T. G.; MAKRAY, S.; CSAPÓ, J. Composition of mares' colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and contents of macro and micro-elements. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 4, p. 403-415, 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/095869469400014G>>.
- DAVIS, R.; GIGUERE, 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 10, p. 1640-1645, 2005. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.2005.227.1640>>.
- DI FILIPPO, P. A.; NOGUEIRA, A. F. DA S.; ANAI, L. A.; et al. PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E DO LÍQUIDO PERITONEAL DE EQUINOS SUBMETIDOS À OBSTRUÇÃO EXPERIMENTAL DO DUODENO, ÍLEO E CÓLON MAIOR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 938-946, 2010. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/cab/article/view/8783/9275>>.
- ERHARD, M. H.; LUFT, C.; REMLER, H. P.; STANGASSINGER, M. Assessment of colostral transfer and systemic availability of immunoglobulin G in new-born foals using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 85, n. 5-6, p. 164-73, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686785>>.
- ERHARD, M. H.; LUFT, C.; REMLER, H. P.; STANGASSINGER, M. Assessment of colostral transfer and systemic availability of immunoglobulin G in new-born foals using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 85, n. 5-6, p. 164-73, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686785>>.
- FLAMINIO, M. J. B. ; RUSH, B. R.; DAVIS, E. G.; et al. Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 3-4, p. 267-285, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242700001495>>.
- FOUCHÉ, N.; GRAUBNER, C.; HOWARD, J. Correlation between serum total globulins and gamma globulins and their use to diagnose failure of passive transfer in foals. **Veterinary journal (London, England: 1997)**, v. 202, n. 2, p. 384-386, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25201248>>.
- FRANZ, L. C.; LANDON, J. C.; LOPES, L. A.; et al. Oral and intravenous immunoglobulin therapy in neonatal foals. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 18, n. 11, p. 742-748, 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080698805054>>.
- GIGUÈRE S, GASKIN JM, MILLER C, B. J. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma

product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 1, n. 220(1), p. 59–63., 2002.

GREINER, M.; GARDNER, I. A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, n. 1-2, p. 3–22, 2000.

HAAS, S. D.; BRISTOL, F.; CARD, C. E. Risk factors associated with the incidence of foal mortality in an extensively managed mare herd. **The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne**, v. 37, n. 2, p. 91–5, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1576626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>..

HAMMER, C. J. ; TYLER, H. D. ; MILLER, P. A. EFFECTS OF ORAL ADMINISTRATION OF CONCENTRATED EQUINE SERUM IgG TO NEWBORN FOALS ON PASSIVE IMMUNITY. **JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE**, v. 20, n. 5, p. 337–338, 2000.

HIGUCHI, T.; ARAKAWA, T.; HASHIKURA, S.; et al. Effect of prophylactic administration of hyperimmune plasma to prevent *Rhodococcus equi* infection on foals from endemically affected farms. **Journal of veterinary medicine**, v. 46, n. 9, p. 641–8, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605374>>..

HOFSAESS, F. R. TIME OF ANTIBODY ABSORPTION IN NEONATAL FOALS. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 4, p. 158–159, 2001.

HURCOMBE, S. D. A.; MATTHEWS, A. L.; SCOTT, V. H. L.; et al. Serum protein concentrations as predictors of serum immunoglobulin G concentration in neonatal foals. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 22, n. 5, p. 573–579, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-4431.2012.00794.x>>..

JEFFCOTT, L. B. Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. **Equine veterinary journal**, v. 6, n. 3, p. 109–15, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4137197>>..

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 2008.

KOHN, C. W.; KNIGHT, D.; HUESTON, W.; JACOBS, R.; REED, S. M. Colostral and serum IgG, IgA, and IgM concentrations in Standardbred mares and their foals at parturition. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 1, p. 64–8, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2759897>>..

KOROSUE, K.; MURASE, H.; SATO, F.; et al. Correlation of Serum IgG Concentration in Foals and Refractometry Index of the Dam's Pre- and Post-Parturient Colostrums: An Assessment for Failure of Passive Transfer in Foals. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 11, p. 1387–1395, 2012. Disponível em: <<http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/jvms/11-0470?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>>..

KURTZ FILHO, M.; DEPRÁ, N.M.; LOPES DE ALDA, J.; CASTRO, I.N.; DE LA CORTE, F.D; SILVA, C. A. M. Parâmetros fisiológicos e etológicos do potro recém-nascido, na raça puro-sangue de corrida. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 34, n. 2, p. 103–108, 1997.

LEBLANC, M. M.; MCLAURIN, B. I.; BOSWELL, R. Relationships among serum immunoglobulin concentration in foals, colostral specific gravity, and colostral immunoglobulin concentration. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 1, p. 57–60, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3733502>>..

LEBLANC, M. M.; TRAN, T.; BALDWIN, J. L.; PRITCHARD, E. L. Factors that influence passive transfer of immunoglobulins in foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 2, p. 179–83, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1559872>>..

MARTINS, C. B.; SILVA, M. A. G. DA; DUARTE, C. A.; et al. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-Rhodococcus equi EM ÉGUAS VACINADAS E POTROS PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 194–200, 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/5207>>. Acesso em: 24/2/2014.

MCCLURE, J. T.; DELUCA, J. L.; LUNN, D. P.; MILLER, J. Evaluation of IgG concentration and IgG subisotypes in foals with complete or partial failure of passive transfer after administration of intravenous serum or plasma. **Equine veterinary journal**, v. 33, n. 7, p. 681–686, 2001.

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. Proceedings AAEP 49th AAEP Ann Conv. **Anais...** v. 49, p.301–305, 2003. Disponível em: <<http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2005/20053193194.pdf>>. .

METZGER, N.; HINCHCLIFF, K. W.; HARDY, J.; SCHWARZWALD, C. C.; WITTUM, T. Usefulness of a commercial equine IgG test and serum protein concentration as indicators of failure of transfer of passive immunity in hospitalized foals. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 2, p. 382–7, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16594598>>. .

OIE - World Organisation for Animal Health. Validation Guideline 3.6.1 Development and Optimisation of Antibody Detection Assays. , 2014. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.1_ANTIBODY_DETECT.pdf>. .

RAIDAL, S. L.; MCTAGGART, C.; PENHALE, J. Effect of withholding macromolecules on the duration of intestinal permeability to colostral IgG in foals. **Australian veterinary journal**, v. 83, n. 1-2, p. 78–81, 2005.

RIOND, B.; WENGER-RIGGENBACH, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Serum protein concentrations from clinically healthy horses determined by agarose gel electrophoresis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 1, p. 73–77, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-165X.2008.00100.x>>. .

SEDLINSKÁ, M.; KREJČÍ, J.; VYSKOČIL, M.; KUDLÁČKOVÁ, H. Postnatal Development of Blood Serum Concentrations of Immunoglobulin IgG, IgA and IgM Isotypes in Suckling Foal. **Acta Veterinaria Brno**, v. 75, n. 2, p. 175–182, 2006. Disponível em: <<http://actavet.vfu.cz/75/2/0175/>>.

TIETZ, N.W. 1970. **Fundamentals of Clinical Chemistry**. Saunders:Toronto.

TYLER-MCGOWAN, C.; HODGSON, J.; HODGSON, D. 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. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.1997.tb13832.x>>.

WÄLCHLI, R. O.; HÄSSIG, M.; EGGENBERGER, E.; NUSSBAUMER, M. Relationships of total protein, specific gravity, viscosity, refractive index and latex agglutination to immunoglobulin G concentration in mare colostrum. **Equine veterinary journal**, v. 22, n. 1, p. 39–42, 1990.

11 ANEXOS

ANEXO 1 - Normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando **compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter** informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. **Os Quadros devem ser** explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas.** Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

ANEXO 2 - Valores individuais de proteína total (mg/dL), determinado por refratômetro manual dos potros nos cinco momentos de avaliação

ID	Sexo	M1	M2	M3	M4	M5
1	M	4200	6400	6600	6800	6000
2	F	4100	5600	6600	6800	5600
3	M	3900	5400	4700	5800	5500
4	F	4600	7000	4300	6800	5900
5	F	4400	6600	6200	7600	6000
7	F	4400	6800	7000	6800	6800
8	F	4400	5800	5600	6000	5600
9	F	4000	6000	6000	6000	6000
10	M	4400	5600	5200	5600	5800
11	M	4400	6000	5600	6000	6000
12	M	4400	4400	6000	6000	6000
13	M	5000	7800	7000	7000	6600
14	F	4600	7000	6800	7200	6200
15	M	4400	5800	4800	5800	6000
16	F	4600	6600	6200	6400	6400
18	M	4200	4800	5400	5800	5600
19	M	4200	5800	6000	6200	5600
20	M	4000	5600	5800	6200	5800
22	M	4400	7200	6600	7000	6200
23	M	4400	5400	5400	5600	5800

ANEXO 3 - Valores individuais de proteína total (mg/dL), determinado por analisador bioquímico, dos potros nos cinco momentos de avaliação.

ID	Sexo	M1	M2	M3	M4	M5
1	M	3960	6430	6585	7825	5990
2	F	3655	5150	6545	6725	5325
3	M	3690	5840	4650	6205	5520
4	F	4430	7280	5610	7220	5745
5	F	4250	6420	6490	7860	6205
7	F	4150	7590	7220	7045	6195
8	F	3930	5550	5355	5830	5175
9	F	3550	5855	5835	5825	5710
10	M	3825	5110	4540	6040	5260
11	M	4280	5925	5615	6415	5600
12	M	3915	5830	5635	6340	5955
13	M	4535	7960	6935	7300	6980
14	F	4090	7390	6955	7680	6535
15	M	4400	6100	5155	6885	5955
16	F	4510	6930	6785	7615	6550
18	M	3980	4695	5980	6015	5715
19	M	4330	6460	6780	6800	6180
20	M	4085	7010	6265	7495	6430
22	M	4115	7890	7375	7120	6245
23	M	4215	5390	5580	5740	5905

ANEXO 4 - Valores individuais de Albumina (mg/dL), determinado por analisador bioquímico, dos potros nos cinco momentos de avaliação.

ID	Sexo	M1	M2	M3	M4	M5
1	M	2915	2500	2675	2800	2960
2	F	2610	2495	2330	2300	2810
3	M	2445	2500	2260	2565	2555
4	F	3340	3120	2570	2940	2715
5	F	3300	3210	3140	2985	2910
7	F	2965	2540	2755	2300	2815
8	F	2920	2530	2650	2805	2655
9	F	2855	2795	2935	2950	2980
10	M	2815	2750	2460	2835	2720
11	M	3130	2990	3270	3200	3055
12	M	3030	3020	2830	3000	3160
13	M	3495	3270	3135	3130	3375
14	F	2725	2615	2410	2555	2735
15	M	3180	2690	2385	2815	2880
16	F	3170	2665	2710	2750	2785
18	M	2660	2560	2935	2735	2940
19	M	2785	2550	2875	1890	3015
20	M	2695	2855	2685	2860	2675
22	M	2870	3015	2765	2840	2900
23	M	3095	2660	2460	2445	2700

ANEXO 5 - Valores individuais das frações proteicas (mg/dL), obtidas através de eletroforese em gel de agarose, dos potros no M1 de avaliação.

ID	Momento	Albumina	α 1-globulina	α 2-globulina	β -globulina	γ -globulina
1	1	2350	410	420	730	50
2	1	2230	200	490	560	170
3	1	1610	350	240	250	240
4	1	2840	420	380	650	140
5	1	2920	290	340	650	50
7	1	2990	420	380	310	60
8	1	2580	380	250	680	40
9	1	2330	270	320	590	40
10	1	2330	360	410	680	50
11	1	2850	230	490	560	150
12	1	2600	320	290	540	160
13	1	3300	430	410	330	60
14	1	2490	400	440	680	70
15	1	2900	440	330	670	40
16	1	2850	450	390	710	110
18	1	2460	500	510	480	30
19	1	2820	320	330	750	100
20	1	2530	470	340	710	40
22	1	2720	430	250	680	30
23	1	2630	440	350	750	40

ANEXO 6 - Valores individuais das frações proteicas (mg/dL), obtidas através de eletroforese em gel de agarose, dos potros no M2 de avaliação.

ID	Momento	Albumina	α 1-globulina	α 2-globulina	β -globulina	γ -globulina
1	2	2690	440	410	820	2060
2	2	2350	220	460	700	1420
3	2	2730	450	360	840	1460
4	2	3200	470	470	700	2440
5	2	3150	400	240	780	1840
7	2	3350	490	580	710	2470
8	2	2690	330	290	880	1360
9	2	2780	220	310	620	1920
10	2	2460	310	440	720	1180
11	2	3080	280	270	820	1470
12	2	2840	380	270	580	1760
13	2	3670	680	510	550	2560
14	2	3070	410	450	910	2550
15	2	2950	400	230	780	1740
16	2	3060	370	420	780	2300
18	2	2580	390	370	630	710
19	2	2840	430	260	1390	1530
20	2	3010	500	410	1210	1880
22	2	3380	460	310	990	2750
23	2	2610	360	360	1150	920

ANEXO 7 - Valores individuais das frações proteicas (mg/dL), obtidas através de eletroforese em gel de agarose, dos potros no M3 de avaliação.

ID	Momento	Albumina	α 1-globulina	α 2-globulina	β -globulina	γ -globulina
1	3	2670	390	450	890	2170
2	3	2400	230	580	800	2540
3	3	2100	380	270	680	1150
4	3	2440	380	310	580	1900
5	3	3190	510	220	650	1930
7	3	3310	390	610	650	2270
8	3	2580	370	270	920	1200
9	3	2690	250	290	720	1880
10	3	2170	350	380	690	950
11	3	3000	280	300	760	1430
12	3	2730	400	290	790	1420
13	3	3490	370	580	490	2000
14	3	2840	420	440	990	2240
15	3	2540	380	230	640	1350
16	3	3060	470	280	840	2130
18	3	3250	360	150	590	1630
19	3	2980	470	350	870	2100
20	3	2730	530	340	900	1770
22	3	3140	470	190	1000	2560
23	3	2660	420	230	790	1480

ANEXO 8 - Valores individuais das frações proteicas (mg/dL), obtidas através de eletroforese em gel de agarose, dos potros no M4 de avaliação.

ID	Momento	Albumina	α 1-globulina	α 2-globulina	β -globulina	γ -globulina
1	4	3160	570	430	1240	2420
2	4	2510	280	410	1220	2300
3	4	2660	520	340	1200	1480
4	4	3090	490	420	830	2250
5	4	2990	320	540	1290	2710
7	4	3240	370	360	1050	2030
8	4	3140	270	310	850	1250
9	4	2630	300	260	930	1690
10	4	2810	450	470	1110	1200
11	4	3150	340	330	1120	1460
12	4	2980	450	370	1030	1480
13	4	3600	420	410	1010	1870
14	4	2960	610	520	1110	2470
15	4	3160	560	280	1060	1820
16	4	3330	530	330	1150	2270
18	4	3100	420	310	720	1470
19	4	2940	460	350	1020	2030
20	4	3160	700	430	1160	2040
22	4	2900	520	280	960	2450
23	4	2610	500	180	930	1520

ANEXO 9 - Valores individuais das frações proteicas (mg/dL), obtidas através de eletroforese em gel de agarose, dos potros no M2 de avaliação.

ID	Momento	Albumina	α 1-globulina	α 2-globulina	β -globulina	γ -globulina
1	5	2410	700	380	1400	1100
2	5	2230	560	500	1560	680
3	5	2230	560	500	1560	680
4	5	2460	610	450	1320	900
5	5	2660	600	320	1240	960
7	5	2750	490	410	1610	930
8	5	2600	580	490	920	570
9	5	2500	530	410	1470	810
10	5	2290	610	480	1280	600
11	5	2510	410	500	1510	670
12	5	2800	570	520	1330	730
13	5	3110	570	450	1110	1750
14	5	2680	700	480	1080	1580
15	5	2740	630	350	1420	820
16	5	2670	590	570	1720	1010
18	5	3040	470	400	1060	740
19	5	2810	530	490	1260	1090
20	5	2420	920	520	1390	1180
22	5	2370	740	410	1170	1550
23	5	2440	510	500	1260	1180

ANEXO 10 - Valores individuais de IgG séricos dos potros (mg/dL), nos cinco momentos, determinados por S-ELISA e IDRS.

ID	M1		M2		M3		M4		M5	
	S-ELISA	IDRS	S-ELISA	IDRS	S-ELISA	IDRS	S-ELISA	IDRS	S-ELISA	IDRS
1	6,08	43,30	2305,34	5928,74	2306,75	7958,17	3089,01	5928,74	2055,69	5444,86
2	7,46	70,70	2529,10	7958,17	2795,28	6422,00	3484,00	6422,00	2116,97	2738,95
3	6,09	48,37	3028,36	4049,63	3090,66	3603,34	2498,12	6174,19	1766,64	2320,85
4	6,07	38,44	3645,83	5928,74	3554,65	6422,00	3353,49	6422,00	1841,58	3603,34
5	10,95	70,70	3229,11	5928,74	2581,02	4505,31	1803,28	4049,63	1505,33	2738,95
7	13,29	96,34	2327,98	6422,00	3633,24	5928,74	3428,02	6422,00	1055,68	3603,34
8	17,29	76,80	1395,13	4049,63	1627,66	4505,31	1725,42	7436,72	605,72	2320,85
9	6,30	33,79	2066,23	5685,63	2257,72	5928,74	2314,72	5928,74	863,09	2738,95
10	37,66	38,44	1682,96	3603,34	894,06	3603,34	1148,83	6672,16	496,39	1122,91
11	20,40	53,64	2276,64	4049,63	1227,62	4505,31	1308,27	6924,66	629,07	3603,34
12	11,80	38,44	1546,29	4505,31	1192,47	4049,63	1157,89	4049,63	822,56	2320,85
13	23,70	70,70	2716,79	6924,66	2607,03	5444,86	1828,60	5444,86	1082,14	3166,45
14	16,57	64,81	2349,38	6422,00	1993,90	6422,00	1695,78	5928,74	864,90	4049,63
15	17,92	48,37	2741,79	5444,86	1335,91	4049,63	2417,46	5928,74	1615,83	2320,85
16	11,24	59,12	2726,47	5444,86	2456,40	5444,86	2418,85	5444,86	1782,77	3166,45
18	11,20	64,81	1231,37	2320,85	2050,63	5928,74	2047,35	5928,74	1310,90	3166,45
19	21,66	53,64	2859,39	4970,39	2131,24	5444,86	2622,40	4049,63	2187,15	2738,95
20	13,91	33,79	2650,00	4505,31	1828,40	5444,86	2269,82	5444,86	1562,79	2320,85
22	18,93	48,37	2919,80	6422,00	3151,14	6422,00	3645,88	6924,66	2527,29	4049,63
23	24,71	64,81	1940,18	4049,63	2914,53	5444,86	3028,94	5685,63	1835,50	3166,45

ANEXO 11 - Valores individuais da Proteína Total (refratômetro e bioquímico), Albumina (bioquímico) e cinco frações proteicas obtidas através de eletroforese em gel de agarose do grupo de éguas (mg/dL).

	Refratômetro	Analisador bioquímico		Eletroforese em gel de agarose			
ID	Proteína total	Proteína total	Albumina	α 1-globulina	α 2-globulina	β -globulina	γ -globulina
1	7400	7165	3180	450	390	1900	1230
2	7400	7340	3600	370	460	1800	1110
3	6800	7145	3530	390	420	1010	1800
4	7600	7785	3870	470	550	1140	1730
5	7200	7645	3770	450	460	1170	1800
7	7400	7145	3000	380	430	1070	2260
8	7200	7190	3780	420	330	1400	1250
9	6600	6505	3410	360	290	1280	1160
10	6800	6455	3380	290	530	1360	890
11	6200	6855	3190	420	390	1200	1650
12	6800	6900	3420	210	300	1240	1730
13	6600	6755	3780	380	350	930	1300
14	7200	7320	3770	330	420	1230	1570
15	8200	8660	4300	550	410	1560	1840
16	7200	7720	4110	390	430	1000	1790
18	6200	6510	3480	370	420	850	1380
19	7200	7700	4200	370	380	1030	1720
20	7200	8035	3820	670	460	1290	1790
22	7400	7545	3940	400	450	1150	1600
23	8200	8150	3640	540	540	1430	2000

ANEXO 12 - Valores individuais do IgG Total, determinado por S-ELISA e IDRS das amostras de soro e colostro do grupo de éguas (mg/dL), bem como os valores de densidade específica e índice BRIX (%) das amostras de colostro.

ID	Soro - IgG (mg/dL)		Colostro - IgG (mg/dL)		Densidade específica	BRIX (%)
	S-ELISA	IDRS	S-ELISA	IDRS		
1	1720,29	7958,17	6559,32	15916,35	1,090	26
2	1353,29	7958,17	12778,32	18591,80	1,130	30
3	1485,72	6924,66	7408,59	17311,66	1,085	25
4	1289,42	6924,66	11983,32	16055,00	1,110	29
5	1672,05	7958,17	11737,98	16055,00	1,075	30
7	2726,81	7958,17	7645,22	16055,00	1,100	28
8	1411,60	7436,72	6394,26	12425,98	1,070	23
9	1280,28	3603,34	12188,99	19895,43	1,100	32
10	1034,95	2320,85	5127,11	18591,80	1,095	30
11	1205,26	3166,45	10308,08	17311,66	1,090	32
12	1224,22	3383,72	4604,25	14821,84	1,080	25
13	972,73	2738,95	6534,61	19895,43	1,100	29
14	1274,52	4505,31	6166,35	16055,00	1,110	32
15	3232,81	4049,63	7256,02	14821,84	1,070	27
16	1937,84	3825,31	6938,50	17311,66	1,075	31
18	1044,66	3383,72	4894,77	17311,66	1,050	28
19	1599,77	3383,72	7562,85	14821,84	1,085	25
20	1497,35	3383,72	4624,44	14821,84	1,090	26
22	1250,58	3825,31	6460,77	16055,00	1,090	28
23	2202,81	2738,95	7113,11	14821,84	1,070	25

ANEXO 13 - Valores individuais da Proteína Total (refratômetro e bioquímico), cinco frações proteicas obtidas através de eletroforese em gel de agarose e IgG total obtido por S-ELISA e IDRS do plasma (utilizado nos potros) dos quatro doadores (mg/dL).

ID	Proteína total (mg/dL)		Frações proteicas (mg/dL)					IgG total (mg/dL)	
	Refratômetro	Bioquímico	Albumina	α 1-globulina	α 2-globulina	β -globulina	γ -globulina	S-ELISA	IDRS
1	6,73	7356,67	2993,33	430,00	256,67	1816,67	1863,33	1987,55	5444,86
2	6,60	7000,00	2896,67	380,00	426,67	1473,33	1826,67	2175,09	4505,31
3	7,07	7540,00	2953,33	406,67	460,00	1726,67	1996,67	1836,43	2738,95
4	6,93	7383,33	3300,00	330,00	383,33	1450,00	1926,67	2104,89	4049,63