

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Rayanne Soalheiro de Souza

**Desenvolvimento, padronização e comparação de técnicas diagnósticas para
avaliação da transferência de imunidade passiva em bezerros**

Belo Horizonte

2020

Rayanne Soalheiro de Souza

**Desenvolvimento, padronização e comparação de técnicas diagnósticas para
avaliação da transferência de imunidade passiva em bezerros**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Elias Jorge Facury Filho

Coorientadora: Prof. Dra. Fabiola de Oliveira Paes Leme

Belo Horizonte

2020

S729d Souza, Rayanne Soalheiro de. 1991-
Desenvolvimento, padronização e comparação de técnicas diagnósticas para avaliação da transferência de imunidade passiva em bezerros/Rayanne Soalheiro de Souza – 2020.

155f :il.

Orientador: Elias Jorge Facury Filho.

Coorientadora: Fabíola de Oliveira Paes Leme.

Dissertação de Mestrado apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Bezerro - Teses - 2 - Diagnóstico - Teses - 3 – Imunidade – Teses – I – Filho, Elias Jorge Facury – II – Leme, Fabíola de Oliveira Paes - III - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV – Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAYANNE SOALHEIRO DE SOUZA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.


Aprovado(a) em 04 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:



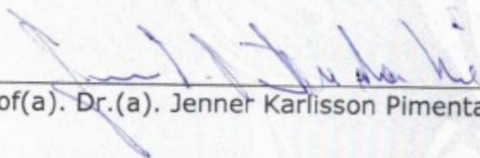
Prof(a). Dr.(a). Elias Jorge Facury Filho
Presidente - Orientador(a)



Prof(a). Dr.(a). Fabíola de Oliveira Paes Leme



Prof(a). Dr.(a). Patterson Patricio de Souza



Prof(a). Dr.(a). Jenner Karlisson Pimenta dos Reis



À minha família e à educação.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus por ter colocado em meu caminho pessoas especiais que me proporcionaram oportunidades ímpares, de modo que não posso duvidar que sempre estive no comando de minha vida.

Agradeço à família ruminantes pela acolhida, apoio e companhia nesse período, por toda contribuição e ajuda em todos os projetos e no experimento.

Agradeço aos meus orientadores, Lobão e Fabiola, por toda orientação, incentivo, apoio e oportunidades, obrigada por me permitirem tanto crescimento e me fazerem ver que não há limites quando há dedicação.

Agradeço aos orientadores de coração, professores Último, Rodrigo e Tiaguinho por compartilharem palavras de atenção, orientação, conversas agradáveis e lanchinhos!

À equipe GEMP, maravilhosa, que tem realizado trabalhos incríveis! Sou muito honrada de ter colaborado com o crescimento do nosso grupo e ter sido convidada a compartilhar meus conhecimentos, cada dia com vocês me fez melhor!

Aos médicos veterinários José, Rafael, Matheus Bauduino, Matheus Serafini e João, pela ajuda e envio das informações das fazendas, valiosas para o estudo.

Aos residentes da clínica de ruminantes e da patologia clínica, pela amizade, disponibilidade e ajuda no experimento. Sem vocês, não haveria esse trabalho.

À equipe RETROLAB, especialmente Professor Jenner e Bruna, pelo carinho, acolhida, atenção e ajuda com o experimento. O trabalho de vocês é incrível e admirável e foi essencial à pesquisa!

À equipe do CEFET-MG, professor Patterson, professor Cardeal, Marco Túlio, Gabriel e Luiz da InventVison pela excelência na colaboração, ensinamentos, disponibilidade e compreensão.

A todos os funcionários da UFMG. Porteiros (as), faxineiros (as), técnicos (as) administrativos e de laboratório, especialmente Daiane, Nathaniel, Grazy e Pó. O trabalho de vocês é essencial à ciência.

Agradeço especialmente à Morgana, Isabela, Joelma, Rosana e Luana que tanto me ajudaram no experimento e me ensinaram nessa trajetória. O carinho e amizade de vocês me fortaleceu muito!

Aos queridos amigos e parceiros Marco Túlio, Mari e Jéssica, sempre bem-vindos à Clínica de Ruminantes, fontes de apoio, ajuda científica e admiração!

À minhas amigas Cha, Jeny, Nathy e Pris, por superarem as barreiras do tempo e distância e não medirem esforços para me verem bem.

Aos meus pais, Elizane e Wagner e irmãos, Roni, Rangel, Rayssa e Raddija como sempre, porto-seguro, grandes apoiadores dos meus sonhos e que tornam tudo possível. Amo vocês!

Meus tios (as) e primos (as) sempre torcendo e compreendendo as ausências.

À CAPES pela concessão da bolsa que permitiu minha dedicação integral aos estudos e à pesquisa.

“O futuro é o passado em preparação”

Pierre Dac

RESUMO

O monitoramento da Transferência de Imunidade Passiva (TIP) deve ser realizado nas fazendas porque os bezerros nascem hipogamaglobulinêmicos e são dependentes da ingestão do colostro para adquirir imunoglobulinas (Ig) maternas. A Falha na Transferência da Imunidade Passiva (FTIP) está relacionada ao maior risco de morbidade, mortalidade e menores taxas de crescimento dos bezerros, além de outros prejuízos. Existem diversas técnicas disponíveis para avaliar a TIP e, nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi (1) apresentar uma revisão de literatura sobre estas técnicas; (2) padronizar a técnica considerada padrão-ouro (teste de referência), a Imunodifusão Radial (IDR), a fim de utilizá-la na comparação de técnicas de avaliação da TIP (inclusive a técnica desenvolvida); (3) determinar os pontos de corte para avaliação TIP em bezerros em condições de clima tropical de criação com as técnicas de: refratometria óptica de proteína, refratometria digital de proteína e BRIX, análise bioquímica da proteína total e frações em analisador bioquímico automático, além da técnica desenvolvida da turvação do sulfito de sódio e (4) desenvolver um teste rápido baseado na modificação da técnica já descrita de turvação do sulfito de sódio, que permita determinar, de forma dicotômica, se o bezerro adquiriu ou não a imunidade passiva e compará-lo à outras técnicas para avaliação da TIP. Para a realização do presente trabalho avaliou-se 418 amostras de bezerros de 24 a 48 horas de idade realizando-se as técnicas de IDR descritas anteriormente, além do teste de 17 concentrações de soluções de sulfito de sódio. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Analisou-se os resultados de mortalidade e número de tratamentos dos bezerros a fim de determinar os pontos de corte para as técnicas avaliadas em condições de criação de bezerros em clima tropical. A técnica de Imunodifusão Radial padronizada *in house* estimou a concentração de imunoglobulinas, mas não foi eficiente na determinação da concentração da imunoglobulina G de amostras de soro de bezerros para a avaliação da Transferência da Imunidade Passiva. A dosagem de Globulinas foi mais representativa da TIP, devendo ser utilizada como técnica padrão-ouro. Em condições tropicais de criação de bezerros, os pontos de corte para Boa e Excelente TIP foram, respectivamente, 7,0 g/dL e 9,0 g/dL para Proteína Total, 4,8 g/dL e 7,4 g/dL para Globulinas e 2,0 g/dL e 3,5 g/dL para IgG. Os refratômetros superestimaram as concentrações de Proteína Total, necessitando aumento no seu ponto de corte ou um fator de correção para seu uso. Determinou-se que a

concentração de 13% de sulfito de sódio deve ser utilizada no teste rápido para avaliação da TIP, uma vez que ela é que mais se aproxima dos pontos de corte para Boa TIP em condições tropicais de criação de bezerros.

Palavras-chave: Turvação do sulfito de sódio; imunodifusão radial; globulinas; medicina de produção.

ABSTRACT

Monitoring Transfer of Passive Immunity (TPI) should be performed on farms because calves are born hypogammaglobulinemic and are dependent on colostrum ingestion to acquire maternal immunoglobulins (Ig). Failure of Transfer of Passive Immunity (FTPI) is related to increased risk of morbidity, mortality, lower calf growth rates, and other impairments. There are several techniques available to evaluate TPI and, in this sense, the objective of the present study was (1) to present a literature review on these techniques; (2) standardize the technique considered the gold standard (reference test), Radial Immunodiffusion (RID), in order to use it in the comparison of TPI evaluation techniques; (3) determine the cutoff points for evaluation of TPI in calves under tropical rearing conditions for total protein on optical refractometry, total protein and Brix on digital refractometry, biochemical analysis for total protein and fractions in automated biochemical analyzer, and the developed technique of sodium sulfite turbidity test using the standardized RID technique and (4) to develop a rapid test based on the modification of the previously described technique of sodium sulfite turbidity test, which allows a dichotomous determination of whether the calf has acquired passive immunity and compare it to other techniques for assessing TPI. For this study, 418 samples of 24 to 48 hour-old calves were evaluated using standardized RID technique, total protein on optical refractometry, total protein and Brix on digital refractometry, biochemical analysis of total protein and fractions on automatic biochemical analyzer for all samples. In addition, to testing 17 concentrations of sodium sulfite solutions. All analyzes were performed in triplicate. Calf mortality and number of treatments were analyzed to determine the cutoff points for the techniques evaluated under calf rearing conditions in tropical climate. The in-house standardized RID technique estimated immunoglobulin concentration, but was not efficient in determining the immunoglobulin G concentration of calf serum samples for the evaluation of TPI. The dosage of globulins was more representative of TPI and should be used as the gold standard technique. Under tropical calf rearing conditions, the cutoff points for Good and Excellent TPI were, respectively, 7.0 g/dL and 9.0 g/dL for Total Protein, 4.8 g/dL and 7.4 g/dL for Globulins and 2.0 g/dL and 3.5 g/dL for IgG. Refractometers overestimated total protein concentrations, requiring an increase in their cutoff or a correction factor for their use. It has been determined that the 13%

sodium sulfite concentration should be used in the rapid test for TPI assessment, as it is closest to the cutoff points for Good TPI under tropical calf rearing conditions.

Keywords: Turbidity of sodium sulfite; radial immunodiffusion; globulins; production medicine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

pg

Capítulo 1

Figura 1. Proporção de cada fração de proteína observada na eletroforese de bezerras aos dois dias de idade. 40

Capítulo 2

Figura 1. Esquema de purificação da imunoglobulina (Ig) bovina realizada segundo Mckinney e Parkinson (1987) com modificações. 67

Figura 2. Fluxograma da produção da Imunodifusão Radial. 70

Figura 3. SDS-PAGE para determinação da pureza do IgG bovina e do purificado de anti-imunoglobulina G bovino produzido em coelhos. Faixa 1: IgG Bovino purificado, Faixa 2: Soro do coelho 1 puro, Faixa 3: Purificado de anti-imunoglobulina G bovina produzido em coelho, Faixa 4: Marcadores de peso molecular (15–180 kDa). 74

Figura 4. Imunodifusão Dupla em Gel de Ágar (IDGA) com titulação dos soros dos coelhos (A) e com amostras de soro de bezerras (B). 74

Figura 5. Efeito da característica de lipemia da amostra no teste de Imunodifusão Radial. 76

Figura 6. Efeito da característica de hemólise da amostra no teste de Imunodifusão Radial. 76

Figura 7. Efeito da característica de icterícia da amostra no teste de Imunodifusão Radial. 77

Capítulo 3

Figura 1. Número de animais por categoria em (A) imunoglobulina por IDR padronizada *in house*, (B) Globulinas em Analisador Bioquímico Automático e (C) Proteína Total em Analisador Bioquímico Automático. 92

Figura 2. Número de animais por categoria em (A) refratômetro óptico de Proteína Total, (B) refratômetro digital de Proteína Total e (C) refratômetro digital Brix. 93

Figura 3. Regressões e coeficientes de correlação entre Imunodifusão Radial (IDR) padronizada, Globulinas e Proteína Total (PT) em Analisador Bioquímico Automático (ABA), refratômetro digital Brix, refratômetro óptico de Proteína Total e coeficientes de correlação. 94

Figura 4. Regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e concentração de imunoglobulina pela IDR (amostra de soro às 48 horas de idade). A linha mais à direita representa o ponto de corte para a mortalidade de 5% e a linha mais à esquerda representa o ponto de corte para a mortalidade de 10%. 95

Figura 5. Regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e concentração de globulina em analisador bioquímico automático (amostra de soro às 48 horas de idade). 95

Figura 6. Regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e concentração de proteína total em analisador bioquímico automático (amostra de soro às 48 horas de idade). 95

Figura 7. Regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e porcentagem Brix no refratômetro digital (amostra de soro às 48 horas de idade). 96

Figura 8. Regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e proteína total no refratômetro óptico (amostra de soro às 48 horas de idade). 96

Figura 9. Regressão linear entre a Proteína Total em analisador bioquímico automático e refratômetro óptico de Proteína Total (amostra de soro às 48 horas de idade). 102

Figura 10. Regressão linear entre a Proteína Total em analisador bioquímico automático e refratômetro digital de Proteína Total (amostra de soro às 48 horas de idade). 102

Capítulo 4

Figura 1. Curva ajustada da concentração de 12% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. 130

Figura 2. Curva ajustada da concentração de 12,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 130

Figura 3. Curva ajustada da concentração de 13% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 130

Figura 4. Curva ajustada da concentração de 13,15% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 131

Figura 5. Curva ajustada da concentração de 14% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 131

Figura 6. Curva ajustada da concentração de 14,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 131

Figura 7. Curva ajustada da concentração de 15% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 132

Figura 8. Curva ajustada da concentração de 15,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 132

Figura 9. Curva ajustada da concentração de 16% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 132

Figura 10. Curva ajustada da concentração de 16,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 133

Figura 11. Curva ajustada da concentração de 17% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 133

Figura 12. Curva ajustada da concentração de 17,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 133

Figura 13. Curva ajustada da concentração de 18% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 134

Figura 14. Curva ajustada da concentração de 18,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 134

Figura 15. Curva ajustada da concentração de 19% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 134

Figura 16. Curva ajustada da concentração de 19,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 135

Figura 17. Curva ajustada da concentração de 20% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. 135

Figura 18. Comparação das médias dos valores da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial entre amostras que turvaram e amostras que não turvaram com a solução de sulfito de sódio à 15%. 135

Figura 19. Comparação das médias dos valores da concentração da imunoglobulina na Imunodifusão Radial entre amostras que turvaram e amostras que não turvaram com a solução de sulfito de sódio à 13%. 136

Anexos

Figura 1 – Modelo para ordenação de poços para placa de Imunodifusão Radial. 145

Figura 1 – Recipiente do teste rápido contendo a solução de sulfito de sódio em concentração e volumes conhecidos. 153

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Métodos de avaliação da Transferência da Imunidade Passiva (TIP). 31

Tabela 2. Média e desvio-padrão das concentrações de α -globulinas, β -globulinas, γ -globulinas, albumina e proteína total de bezerros mal colostrados, bem colostrados e excelentemente colostrados. 41

Capítulo 3

Tabela 1. Média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo, coeficiente de variação, valores válidos, correlação intraclasse, coeficiente de variação intra-indivíduo e coeficiente de variação entre indivíduos para Imunodifusão Radial (IDR) padronizada, refratômetro óptico de Proteína Total (PT), refratômetro digital de Proteína Total, refratômetro digital Brix, Proteína Total (PT), Albumina e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA). 91

Tabela 2. Odds Ratio (OR) calculadas com base na mortalidade para Imunodifusão Radial (IDR) padronizada, Proteína Total (PT) e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA), refratômetro digital Brix, refratômetro óptico de Proteína Total e refratômetro digital de Proteína Total. 97

Tabela 3. Regressão logística entre número médio de tratamentos até 90 dias e imunoglobulinas pela Imunodifusão Radial (IDR) (amostra de soro às 48 horas de idade). 98

Tabela 4. Regressão logística entre número médio de tratamentos de até 90 dias e globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA) (amostra de soro às 48 horas de idade). 98

Tabela 5. Regressão logística entre número médio de tratamentos de até 90 dias e Proteína Total (PT) em Analisador Bioquímico Automático (amostra de soro às 48 horas de idade). 99

Tabela 6. Regressão logística entre número médio de tratamentos de até 90 dias e Porcentagem Brix em refratômetro digital (amostra de soro às 48 horas de idade). 99

Tabela 7. Regressão logística entre número médio de tratamentos de até 90 dias e Proteína Total (PT) em refratômetro óptico (amostra de soro às 48 horas de idade). 100

Tabela 8. Odds Ratio (OR) calculadas com base no número de tratamentos (i.e., morbidade) e os pontos de corte para Imunodifusão Radial (IDR) padronizada, Proteína Total (PT) e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA), refratômetro digital Brix e refratômetro óptico de Proteína Total. 101

Tabela 9. Valores de referência para bezerros de 24 a 48 horas de idade, medida central e pontos de corte para mortalidade de 10% e 5% (metas para boa e excelente Transferência de Imunidade Passiva (TIP), respectivamente) para Imunodifusão Radial (IDR) padronizada *in house*, refratômetro óptico de Proteína Total, refratômetro digital de Proteína Total, refratômetro digital Brix, Proteína Total (PT), Albumina e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA). 101

Capítulo 4

Tabela 1. Estatísticas da qualidade do ajuste para as concentrações de sulfito de sódio testadas (12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% e 20%). 129

Tabela 2. Características do teste diagnóstico de solução de sulfito de sódio à 15% para avaliação da Transferência de Imunidade Passiva comparado aos testes de Imunodifusão Radial (IDR), Refratômetro digital Brix, Refratômetro óptico de Proteína Total, Proteína Total e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA) e seus respectivos pontos de corte (valores entre parênteses). 137

Tabela 3. Características do teste diagnóstico de solução de sulfito de sódio à 13% para avaliação da Transferência de Imunidade Passiva comparado aos testes de Imunodifusão Radial (IDR), Refratômetro digital Brix, Refratômetro óptico de Proteína Total, Proteína Total e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA) e seus respectivos pontos de corte (valores entre parênteses). 137

Tabela 4. Características dos testes diagnósticos de solução de sulfito de sódio à 13% e 15% para avaliação da Transferência de Imunidade Passiva comparado aos dados de mortalidade. 138

Tabela 5. Avaliação dos custos com insumo para a produção de uma unidade do teste rápido para diagnóstico da transferência de imunidade passiva em bezerros. 142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABMVZ	Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
ATIP	Adequada Transferência de Imunidade Passiva
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ELISA	Do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FTIP	Falha da Transferência da Imunidade Passiva
GGT	Gama Glutamiltransferase
IDGA	Imunodifusão Dupla em Gel de Ágar
IDR	Imunodifusão Radial
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
POC	Do inglês <i>Point Of Care</i>
STIGA	Do inglês <i>Split Trealase Immunoglobulin G Assay</i>
TIP	Transferência da Imunidade Passiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA: MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS.....	22
2.1. <i>Resumo</i>	22
2.2. <i>Abstract</i>	23
2.3. <i>Introdução</i>	23
2.4. <i>Métodos de avaliação da transferência da imunidade passiva</i>	30
2.4.1. <i>Métodos diretos</i>	32
2.4.1.1. <i>Imunodifusão Radial</i>	32
2.4.1.2. <i>Imunoensaios Turbidimétricos</i>	34
2.4.1.3. <i>Ensaio De Imunoabsorção Enzimática (ELISA)</i>	35
2.4.1.4. <i>Eletroforese</i>	36
2.4.1.5. <i>Método Espectroscópico De Infravermelho Por Transmissão e Por Refletância Total Atenuada (ATR)</i>	37
2.4.1.6. <i>Teste Da Imunoglobulina G Por Trealase Dividida (STIGA)</i>	38
2.4.2. <i>Métodos indiretos</i>	39
2.4.2.1. <i>Análise bioquímica das proteínas totais e frações</i>	39
2.4.2.2. <i>Análise bioquímica da Gama Glutamiltransferase (GGT) sérica</i>	44
2.4.2.3. <i>Proteína por refratometria</i>	45
2.4.2.4. <i>Refratômetro de BRIX</i>	47
2.4.2.5. <i>Teste de turvação do sulfato de zinco</i>	48
2.4.2.6. <i>Teste de turvação do sulfato de sódio</i>	49
2.5. <i>Considerações finais</i>	51
<i>Referências</i>	52
3. CAPÍTULO 2 - PADRONIZAÇÃO DA IMUNODIFUSÃO RADIAL PARA AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS.....	61
3.1. <i>Resumo</i>	61
3.2. <i>Abstract</i>	62
3.3. <i>Introdução</i>	62
3.4. <i>Material e métodos</i>	65
3.4.1. <i>Amostras de soro</i>	65
3.4.2. <i>Padronização da técnica de Imunodifusão Radial</i>	66
3.4.2.1. <i>Purificação da imunoglobulina bovina</i>	66
3.4.2.2. <i>Obtenção da anti-imunoglobulina bovina em coelhos</i>	68
3.4.2.3. <i>Purificação da anti-imunoglobulina bovina</i>	69
3.4.2.4. <i>Produção da Imunodifusão Radial</i>	69
3.4.2.5. <i>Avaliação da especificidade da IDR</i>	71
3.4.3. <i>Análise estatística</i>	71
3.5. <i>Resultados e Discussão</i>	72
3.5.1. <i>A Imunodifusão Radial</i>	72
3.5.2. <i>Pureza dos substratos utilizados para a produção da IDR</i>	73
3.5.3. <i>Interferentes da técnica</i>	75

3.5.4. <i>Uso da IDR como padrão-ouro para a avaliação da Transferência de Imunidade Passiva em Bezerros</i>	77
3.6. <i>Conclusão</i>	78
3.7. <i>Agradecimentos</i>	78
<i>Referências</i>	78
4. CAPÍTULO 3 – ESTUDO DE PONTOS DE CORTE PARA AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS EM CONDIÇÕES DE CLIMA TROPICAL DE CRIAÇÃO	81
4.1. <i>Resumo</i>	81
4.2. <i>Abstract</i>	82
4.3. <i>Introdução</i>	82
4.4. <i>Material e métodos</i>	85
4.4.1. <i>Amostras</i>	85
4.4.2. <i>Crítérios de inclusão</i>	86
4.4.3. <i>Procedimentos</i>	86
4.4.4. <i>Análises da Proteína Total e Albumina Sérica no analisador bioquímico automático</i>	86
4.4.5. <i>Refratometria óptica de Proteína Total</i>	87
4.4.6. <i>Refratometria digital BRIX e Proteína Total</i>	87
4.4.7. <i>Imunodifusão Radial padronizada in house</i>	87
4.4.8. <i>Dados de mortalidade e morbidade</i>	88
4.4.9. <i>Análises estatísticas</i>	89
4.5. <i>Resultados</i>	91
4.6. <i>Discussão</i>	103
4.6.1. <i>Padrão-ouro para Transferência de Imunidade Passiva</i>	103
4.6.2. <i>Importância da Transferência de Imunidade Passiva em bezerros em condições tropicais de criação</i>	105
4.6.3. <i>Valores de Referência para bezerros de 24 a 48 horas de idade, pontos de corte para Transferência de Imunidade Passiva para condições de criação em clima tropical</i> .	109
4.7. <i>Conclusão</i>	116
<i>Referência bibliográfica</i>	116
5. CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS	120
5.1. <i>Resumo</i>	120
5.2. <i>Introdução</i>	120
5.3. <i>Objetivos</i>	123
5.3.1. <i>Objetivos gerais</i>	123
5.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	123
5.4. <i>Material e métodos</i>	124
5.4.1. <i>Amostras</i>	124
5.4.2. <i>Procedimentos</i>	125
5.4.2.1. <i>Teste de turvação do Sulfito de Sódio modificado</i>	125
5.4.2.2. <i>Análises da Proteína Total e Albumina Sérica no analisador bioquímico automático</i>	126
5.4.2.3. <i>Refratometria óptica de Proteína Total</i>	126

5.4.2.4.	<i>Refratometria digital BRIX e Proteína Total</i>	126
5.4.2.5.	<i>Imunodifusão Radial padronizada in house</i>	126
5.4.3.	Dados de mortalidade	127
5.4.4.	Análise estatística	127
5.5.	Resultados	128
5.6.	Discussão	138
5.6.1.	Custo da técnica	141
5.7.	Conclusão	142
	Referências bibliográficas	142
	ANEXOS	145
	ANEXO 1 Modelo de poços para placa de IDR	145
	ANEXO 2 Protocolo IDR, Formulário e Planilha para conversão dos resultados da IDR e vídeo da técnica de IDR	146
	ANEXO 3 Peças da patente “Teste rápido para diagnóstico da transferência de imunidade passiva em bezerros”	147
	RESUMO	147
	DESCRIÇÃO	148
	FIGURA	153
	REIVINDICAÇÕES	154

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo propõe um novo método para avaliação a campo da Transferência de Imunidade Passiva (TIP) em bezerros baseado na modificação da técnica de turvação do sulfito de sódio e o compara com outras técnicas, comercialmente disponíveis. Além disso, este estudo também avaliou a técnica de Imunodifusão Radial *in house* e determinou os pontos de corte para condições de criação de clima tropical para diversas técnicas disponíveis para a avaliação da TIP, como a refratometria óptica de proteína, a refratometria digital de proteína e BRIX, análise bioquímica da proteína total e frações em analisador bioquímico automático, além da técnica desenvolvida da turvação do sulfito de sódio utilizando a técnica de IDR padronizada.

Optou-se por apresentar o presente trabalho em forma de capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma revisão de literatura sobre o tema. Já o segundo capítulo trata da padronização da técnica de Imunodifusão Radial (IDR) *in house*. O terceiro capítulo apresenta a determinação de pontos de corte para avaliação da transmissão de imunidade passiva em bezerros em condições de clima tropical de criação. O quarto e último capítulo disserta sobre o desenvolvimento de um teste rápido para diagnóstico da transferência de imunidade passiva em bezerros. Os três primeiros capítulos estão escritos nas normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) para posterior publicação. O último capítulo está escrito com base nas normas de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e objetiva-se o depósito da patente da técnica desenvolvida.

O presente trabalho tem caráter multidisciplinar e foi escrito com uma linguagem simplificada, evitando-se o uso de termos técnicos específicos da área, para melhor compreensão de todos avaliadores.

2. CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA: MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS

Revisão de literatura: Métodos diagnósticos da avaliação da transferência de imunidade passiva em bezerros

Literature review: Diagnostic methods for evaluation of passive immunity transfer in calves

Rayanne Soalheiro de Souza¹, Morgana Fabiana da Silva Resende¹, Fabiola de Oliveira Paes Leme², Tiago Facury Moreira², Elias Jorge Facury Filho².

¹Mestrandas do Programa Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais

²Professores do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

2.1. Resumo

Os bezerros recém-nascidos são dependentes da ingestão de colostro para adquirir imunidade passiva. Devido ao tipo de placenta da vaca, os bezerros dependem da ingestão do colostro durante as primeiras horas de vida para adquirem imunoglobulinas (transferência de imunidade passiva). Desse modo, o manejo da colostragem deve ser bem realizado, a fim de favorecer a redução da incidência de doenças e a taxa de mortalidade na criação de bezerros e, também, com o objetivo de melhorar o ganho de peso e a produção futura desses animais. Para verificar a eficiência da colostragem, deve-se monitorar a transferência da imunidade passiva dos bezerros. Vários métodos de avaliação direta e indireta da concentração de imunoglobulina G e ingestão de colostro estão disponíveis, como, por exemplo, o teste de Imunodifusão Radial, os Imunoensaios Turbidimétricos, o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), a técnica de eletroforese, o método espectroscópico de infravermelho e Teste da Imunoglobulina G por Trealase Dividida (STIGA), as técnicas de análise bioquímica das proteínas totais e frações, a proteína por refratometria, o teste de turvação do sulfato de zinco, o teste de turvação do sulfito de sódio e a análise bioquímica da Gama Glutamiltransferase (GGT) sérica.

Palavras chave: imunoglobulinas, métodos de análise, bezerro, monitoramento.

2.2. **Abstract**

Newborn calves are dependent on colostrum ingestion for passive immunity. Due to the type of placenta of the cow, calves depend on colostrum ingestion during the first hours of life to acquire immunoglobulins (transfer of passive immunity). Thus, the management of colostrum should be well performed in order to favor the reduction of disease incidence and mortality rate in calf rearing and also with the objective of improving weight gain and future production of these animals. To monitor efficiency of absorption of colostrum, transfer of passive immunity of calves should be monitored. Several methods for the direct and indirect assessment of immunoglobulin G concentration and intake of colostrum are available, such as Radial Immunodiffusion Test, Turbidimetric Immunoassays, Enzyme Immunosorbent Assay (ELISA), electrophoresis technique, infrared spectroscopic method and Split Trealase Immunoglobulin G Assay (STIGA), biochemical analysis of total protein and fractions, protein refractometer, BRIX refractometer, zinc sulphate turbidity test, sodium sulfite turbidity test and biochemical analysis of serum γ Glutamyltransferase (GGT).

Keywords: immunoglobulins, methods of analysis, calf, monitoring.

2.3. **Introdução**

A Transferência de Imunidade Passiva (TIP) é definida pela absorção da imunoglobulina materna contida no colostro - primeiro leite ordenhado após o parto - pelo intestino delgado do bezerro durante as primeiras 24 horas após o nascimento (BUSH; STALEY, 1980; GODDEN, 2008) e é de extrema importância nessa espécie devido ao tipo placentário da vaca. A vaca possui uma placenta denominada sinepiteliocorial cotiledonar, composta por diversas camadas, sendo elas: (1) Endotélio fetal; (2) Mesênquima (tecido fetal); (3) Epitélio coriônico ou trofoblástico; (4) Epitélio uterino; (5) Estroma endometrial e (6) Endotélio materno (PETER, 2013; SANTOS; SILVA; BELETTI, 2017). Tal quantidade de camadas dificulta a passagem de macromoléculas, como as imunoglobulinas, da circulação materna à circulação fetal, de modo que o bezerro é dependente da ingestão do colostro para adquirir as imunoglobulinas maternas que conferem imunidade passiva contra patógenos (CHASE; HURLEY; REBER, 2008; CORTESE, 2009).

Também chamadas de anticorpos, as imunoglobulinas são produzidas especialmente por plasmócitos e fazem parte da defesa do hospedeiro contra patógenos, pois ligam-se a esses e os neutralizam (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018b).

Os bovinos apresentam cinco tipos de imunoglobulinas (Ig), sendo a principal delas a IgG (dividida em três subclasses: IgG1, IgG2 e IgG3) que, em bezerros de 24 a 36 horas, apresenta concentrações médias na circulação sanguínea de $1,801 \pm 1,534$ g/dL; a IgA com concentrações de $0,11 \pm 0,86$ g/dL (em bezerros de 24 a 36 horas), a IgM cujas concentrações são de $0,154 \pm 0,132$ g/dL (bezerros de 24 a 36 horas), as IgE e IgD que estão presentes em quantidades mínimas na circulação sanguínea (BUTLER, 1969, 1983; BURTON *et al.*, 1989; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; GERSHWIN, 2009). Sendo assim, as imunoglobulinas em bezerros de 24 a 36 horas totalizam, em média, 2,065 g/dL podendo variar entre 0,313 e 3,817 g/gI (BURTON *et al.*, 1989). A principal classe de imunoglobulinas é, portanto, a das IgG que são glicoproteínas cuja estrutura básica é composta por duas cadeias pesadas (H) e duas leves (L) ligadas por pontes de dissulfeto com uma massa molecular de 150 kDa (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Na vaca gestante, dois meses antes do parto, ocorre um aumento das imunoglobulinas séricas, atingindo valores máximos um mês antes do parto e diminuindo rapidamente próximo à parição (WEAVER *et al.*, 2000). Esse processo está relacionado ao transporte das imunoglobulinas G séricas à glândula mamária, para compor o colostro, que se inicia de três a quatro semanas antes do parto. Já as imunoglobulinas A e M são sintetizadas por plasmócitos na própria glândula mamária (GODDEN, 2008; STELWAGEN *et al.*, 2009). Entre um a três dias antes do nascimento do bezerro, o colostro atinge concentrações aproximadas de IgG₁, IgG₂, IgA e IgM de 4,76 g/dL, 0,29 g/dL, 0,39 g/gI e 0,42 g/dL, respectivamente (BUTLER, 1969). Desse modo, ao ingerir o colostro, o bezerro neonato poderá absorver as imunoglobulinas maternas e adquirir a imunidade passiva. Entretanto, o bezerro só é capaz de absorver macromoléculas durante as primeiras 24 horas de vida, por um processo que ocorre nas células intestinais chamado pinocitose, que possibilita a passagem das imunoglobulinas (e de outras moléculas) de forma íntegra do lúmen intestinal para a circulação sanguínea (BUSH; STALEY, 1980; BESSI *et al.*, 2002; QUIGLEY, 2002). A TIP se dá, então, nesse momento de absorção da imunoglobulina materna contida no colostro pelo intestino delgado durante as primeiras 24 horas após

o nascimento (GODDEN, 2008). Essas imunoglobulinas apresentam meia-vida de aproximadamente 28,5 dias na circulação sanguínea do bezerro (MURPHY; HAGEY; CHIGERWE, 2014), auxiliando na proteção contra agentes patogênicos nesse período.

A Falha na Transferência da Imunidade Passiva (FTIP) é definida como uma concentração sérica de IgG menor que 1,0 g/dL em bezerros entre 1 e 7 dias de vida (TYLER *et al.*, 1996; WEAVER *et al.*, 2000; MCGUIRK; COLLINS, 2004; GODDEN, 2008), indicando que o bezerro não foi capaz de absorver as imunoglobulinas maternas do colostro. O ponto de corte foi definido arbitrariamente por Tyler *et al.* (1996) com base em estudos que o precederam e posteriormente foi corroborado por outros experimentos (FURMAN-FRATCZAK; RZASA; STEFANIAK, 2011). É válido salientar que muitas das pesquisas com TIP foram realizadas entre a década de 70 e 90, período no qual se acreditava que o fornecimento de 2 litro de colostro era suficiente para atender às demandas do bezerro neonato. Contudo, a despeito da baixa quantidade de colostro fornecida aos bezerros nesses estudos, já se observava diferenças entre as concentrações de IgG e o impacto dessa diferença na morbidade e mortalidade dos bezerros (FEY, 1962 *apud* STONE; GITTER, 1969; PENHALE *et al.*, 1970; BURTON *et al.*, 1989). O ponto de corte de 1,0 g/dL de IgG para FTIP foi determinado, então, nesse cenário de fornecimento de baixo volume de colostro. Atualmente, é sabido que é necessário fornecer maior volume de colostro aos bezerros (SELMAN; MCEWAN; FISHER, 1971; WEAVER *et al.*, 2000; GODDEN, 2008) e também que os desafios aos animais de produção são cada vez mais crescentes devido ao adensamento e intensificação dos sistemas de produção, o que levanta questionamentos em relação ao ponto de corte que determine a FTIP. O ponto de corte de 1 g/dL de IgG é questionado, sendo que alguns autores sugerem pontos de corte mais elevados, como 1,5 g/dL (DAVIS; DRACKLEY, 1998) ou de 2,0 g/dL à 2,5 g/dL (CHIGERWE; HAGEY; ALY, 2015), que são mais coerentes com os desafios impostos pelos sistemas de criação atuais. Sendo assim, ainda não há um consenso entre os pesquisadores do tema, sendo que a maioria persiste utilizando o ponto de corte de 1 g/dL. Outra questão é a escassez de estudos em condições de criação em climas tropicais, que naturalmente já impõem maiores desafios aos animais e normalmente envolve animais mestiços, que de modo geral, tem concentração de IgG mais elevadas no colostro, e não se sabe, até o momento, se o ponto de corte para a

FTIP seria o mesmo. Nesse sentido, o ponto de corte para FTIP demanda maiores estudos para sua determinação.

No que concerne ao ponto de corte utilizado para determinar a FTIP, o momento da colostragem é bastante crítico nas fazendas devido aos inúmeros fatores que o influenciam e podem levar à FTIP. Dentre as práticas consideradas padrão-ouro para colostragem segundo a *Dairy Calf and Heifer Association* (2016) estão: a ordenha higiênica do colostro para minimizar a contaminação bacteriana do mesmo (< 50.000 UFC/mL e a Contagem de Coliformes Totais < 5.000 UFC/mL); a avaliação da qualidade imunológica do colostro, que deve possuir no mínimo 50 g/L de imunoglobulinas e o fornecimento de volume de colostro igual à 10% do peso vivo do bezerro ao nascimento dentro das duas primeiras horas de vida. Tais práticas foram baseadas em diversos estudos e objetivam favorecer a ingestão da quantidade mínima de imunoglobulinas pelo bezerro neonato (WEAVER *et al.*, 2000; QUIGLEY, 2002; MCGUIRK; COLLINS, 2004; GODDEN, 2008;). Caso haja falha em algum desses requisitos, o bezerro pode não absorver a quantidade desejada de imunoglobulinas e apresentar FTIP (SVENSSON *et al.*, 2003; TROTZ-WILLIAMS; LESLIE; PEREGRINE, 2008; WINDEYER *et al.*, 2014; LORA *et al.*, 2017).

Além de fatores relacionados à colostragem, a eficiência da absorção de imunoglobulinas pelos bezerros também sofre interferência de estresse térmico (TAO *et al.*, 2012) e da nutrição da vaca no pré-parto (HOUGH *et al.*, 1990; QUIGLEY; DREWRY, 1998), trabalho de parto e vitalidade do bezerro ao nascimento (BEAM *et al.*, 2009; FURMAN-FRATCZAK; RZASA; STEFANIAK, 2011; YANG *et al.*, 2015), bem como da temperatura do ambiente onde o mesmo ficará após o nascimento (OLSON *et al.*, 1981; BEAM *et al.*, 2009).

A FTIP está relacionada com maior risco de mortalidade e morbidade, causando prejuízos ao sistema produtivo. Em estudo realizado por Furman-Fratczak, Rzasa e Stefaniak (2011), com 175 bezerros, a incidência de doenças foi de 81,8% para animais com IgG menor que 0,5 g/dL e 26,7% para animais com IgG maior que 1,5 g/dL, sendo que esses animais não apresentaram doença respiratória até o 28° dia de idade. Windeyer *et al.* (2014), em estudo com 2874 bezerras de 19 fazendas de leite comerciais do Canadá e Estados Unidos, reportaram que mais que 20% dos casos de doença respiratória bovina seriam potencialmente evitados pela eliminação

da FTIP e, além disso, observaram que os bezerros que apresentaram FTIP demonstraram peso corporal menor. Lora *et al.* (2018), observando 78 bezerros até os 30 dias de idade relatou que os bezerros com FTIP adoeciam primeiro que aqueles que não possuíam FTIP (6 dias antes), além de possuírem maior risco para infecções entéricas por rotavírus (OR=12) e *Cryptosporidium* spp. (OR=9) (agentes patogênicos causadores de diarreia) e para morte (OR=11). Donovan *et al.* (1998) observaram que bezerros com baixos valores de proteína total no refratômetro (menor que 5,0 g / dL) tiveram 3 a 6 vezes mais chances de morrer nos primeiros seis meses de vida do que aqueles com concentrações séricas de proteína total maior que 6,0 g/dL. Coerentemente, Chigerwe, Hagey e Aly (2015) observaram que um intervalo de concentração de IgG sérica de 2,001 a 2,500 g/dL (adequada TIP) favoreceu a ausência de mortalidade (razão de verossimilhança <1). DeNise *et al.* (1989), observando resultados de Ig de 641 bezerras, identificaram que a TIP foi uma fonte de variação importante para a produção de leite quando esses animais chegaram à primeira lactação (regressão de 8,5 kg de leite/unidade de Ig), além disso, as vacas que apresentaram menores concentrações de Ig no primeiro dia de vida foram mais encaminhadas para o abate devido à baixa produção de leite.

Outro importante aspecto da FTIP é o potencial aumento de uso de antibióticos e, conseqüentemente, o aumento do risco de resistência aos antimicrobianos, uma vez que a FTIP aumenta o risco de doenças, principalmente respiratórias e diarreia (BERGE *et al.*, 2005). O uso destas medicações em fazendas ocorre, muitas vezes, de forma abusiva e incorreta e, segundo Thakur e Panda (2017), o uso inadequado de antimicrobianos é o maior contribuinte para o desenvolvimento de resistência e deve ser considerado como um problema de Saúde Única, uma vez que os animais podem se tornar reservatórios de bactérias resistentes que podem ser transmitidas ao homem e ao ambiente. Desse modo, a adequada TIP implica no uso racional de antibióticos em fazendas, uma vez que favorece a saúde dos animais e redução do uso de medicações, demanda essa, fortemente relacionada ao combate à resistência à antimicrobianos, cada vez mais crescente no mundo (O'NEILL, 2016).

Raboisson, Trillat e Cahuzac (2016) estimaram os custos totais médios (intervalo de confiança de 95%) por bezerro leiteiro com FTIP em € 60 (€ 10-109), variando entre € 52 (melhor cenário) e € 285 (pior cenário), com um aumento de aproximadamente

50% para bezerros de corte. Assim, a FTIP implica também em um importante impacto econômico nos sistemas de criação de bezerros.

Estima-se que a prevalência de FTIP nos Estados Unidos tenha reduzido de 40% nos anos de 1991-1992 para 19,7% em 2007 (BEAM *et al.*, 2009) e para 12,1% em 2014 (SHIVLEY *et al.*, 2018), provavelmente devido às melhorias nos manejos dos sistemas de criação de bezerros no sentido de monitorar a TIP e corrigir as falhas. No Canadá, a prevalência da FTIP variou entre 43,3% e 37,1% (ELSOHABY *et al.*, 2019a; TROTZ-WILLIAMS; LESLIE; PEREGRINE, 2008), na Itália foi estimada em 41% (LORA *et al.*, 2017), na Austrália, variou de 41,9% a 36,2% entre rebanhos (VOGELS; CHUCK; MORTON, 2013; ABUELO *et al.*, 2019) e na Nova Zelândia, a prevalência da FTIP foi de 25% (LAWRENCE *et al.*, 2017).

No Brasil, Silper *et al.*, (2012) avaliaram a transferência de imunidade em 186 bezerros mestiços Holandês Zebu, que compõem grande parte do rebanho nacional e observaram que 88,3% dos bezerros apresentaram proteína total acima de 5,5g/dL (prevalência de FTIP de 11,7%), indicando que, apesar da colostragem não ter sido assistida, houve adequada TIP. Segundo os autores, esse resultado pode ser explicado pela alta qualidade do colostro das vacas mestiças Holandês-Zebu, (relacionada com o menor volume produzido e idade ao primeiro parto mais tardia), pelo fato de os bezerros serem leves e as mães possuírem úbere com inserção mais alta, o que facilitaria a ingestão do colostro. Já Moraes *et al.* (2000) observaram prevalência de FTIP de 16,1% em estudo com 87 bezerras de um rebanho do estado do Rio Grande do Sul. Feitosa *et al.* (2001), avaliando 40 bezerros da raça holandesa de um rebanho brasileiro que ingeriram colostro *ad libitum*, observaram que 22,5% dos animais apresentavam proteína total menor que 5,5g/dL. No entanto, não foram encontrados, dentro das pesquisas dos autores do presente estudo, trabalhos avaliando a FTIP em rebanhos no Brasil, seja regional ou nacionalmente, sinalizando a necessidade de mais pesquisas nesse sentido.

É importante salientar que baixas concentrações de imunoglobulinas não causam necessariamente um aumento da mortalidade/morbidade, assim como altas concentrações de imunoglobulinas não garantem a sobrevivência do bezerro, uma vez que existem outros fatores que afetam essas taxas (ambiente, estado nutricional e exposição à patógenos, por exemplo), ou seja, tanto a mortalidade quanto a

morbidade à doenças são multifatoriais (DAVIS; DRACKLEY, 1998; WINDEYER *et al.*, 2014). Contudo, a imunização dos bezerros por meio da colostragem deve ser bem conduzida, pois pode auxiliar na redução de intercorrências de doenças e da taxa de mortalidade dos bezerros, além de estar associada à melhoria de aspectos produtivos, como a taxa de crescimento e produção de leite na primeira lactação, além dos fatores econômicos envolvidos nos tratamentos necessários e na baixa de desempenho produtivo (DONOVAN *et al.*, 1998; WINDEYER *et al.*, 2014; RABOISSON; TRILLAT; CAHUZAC, 2016; LORA *et al.*, 2018).

Diante dos impactos produtivos, sanitários e econômicos que a FTIP pode acarretar e das elevadas prevalências de FTIP em diversos países, maior atenção precisa ser dada a este problema no mundo inteiro (LORA *et al.*, 2017). O monitoramento da TIP possibilita identificar as falhas no manejo para corrigi-las e, assim, melhorar a condição de saúde dos bezerros (MCGUIRK; COLLINS, 2004). Segundo Beam *et al.* (2009) a FTIP é mais prevalente em fazendas que não monitoram rotineiramente a transmissão da imunidade passiva, apresentando 13,8 vezes mais chances de ter bezerros apresentando FTIP que fazendas que realizam este monitoramento. Obviamente, o simples fato de monitorar a TIP não provoca a redução de bezerros com FTIP, porém denota que o manejo da colostragem e melhorias que favorecem a adequada transferência de imunidade passiva nos bezerros são relevantes para aquela propriedade. Em estudo realizando o *benchmark* com 18 fazendas de gado holandês no Canadá, Atkinson, Von Keyserlingk e Weary (2017) mostraram que fazendas que aderiram ao programa de monitoramento da TIP e implementaram mudanças no manejo da fazenda, experimentaram melhora na *performance* e obtiveram redução na prevalência de FTIP com uma média de $21 \pm 10\%$ de FTIP antes contra $11 \pm 10\%$, após o *benchmarking* (média (\pm DP) de $21 \pm 10\%$ de FTIP antes do *benchmarking*, contra $11 \pm 10\%$ após as alterações no manejo; $P < 0,01$).

Sendo assim, para garantir que os bezerros foram adequadamente imunizados e que a colostragem está sendo eficaz, é necessário dosar direta ou indiretamente a imunoglobulina no soro dos animais. A principal técnica para a dosagem direta de imunoglobulinas, segundo a literatura, é a Imunodifusão Radial (IDR), considerada padrão-ouro para avaliar a TIP em bezerros (WEAVER *et al.*, 2000; GODDEN, 2008). Além dessa, foram desenvolvidas outras técnicas com o objetivo de avaliar diretamente a imunoglobulina, como os Imunoensaios Turbidimétricos (ALLEY;

HAINES; SMITH, 2012; ELSOHABY; KEEFE, 2015), o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - ELISA (GELSINGER *et al.*, 2015), a eletroforese (PFEIFFER *et al.*, 1977), o método espectroscópico de infravermelho por Transmissão e por Refletância Total Atenuada - ATR (ELSOHABY *et al.*, 2015, 2016) e o Teste da Imunoglobulina G por Trealase Dividida - STIGA (DRIKIC *et al.*, 2018).

A maioria dos testes têm sido desenvolvidos com o objetivo de serem realizados à campo (testes *point-of-care* - POC) e substituir a IDR como padrão-ouro. Para a dosagem indireta de imunoglobulinas, têm-se as técnicas de análise bioquímica das proteínas totais e frações (HOGAN *et al.*, 2015), análise bioquímica da Gama Glutamiltransferase (GGT) sérica (GÜNGÖR; BASTAN; ERBIL, 2004; HOGAN *et al.*, 2015), a proteína por refratometria (PFEIFFER *et al.*, 1977a; TYLER *et al.*, 1996; QUIGLEY, 2001a; MORRILL *et al.*, 2013; DEELEN *et al.*, 2014; ELSOHABY; MCCLURE; KEEFE, 2015; ELSOHABY *et al.*, 2019b), por refratômetro de BRIX (MORRILL *et al.*, 2012, 2013; DEELEN *et al.*, 2014; ELSOHABY; MCCLURE; KEEFE, 2015; QUIGLEY, 2016; ELSOHABY *et al.*, 2019b), o teste de turvação do sulfato de zinco (PFEIFFER *et al.*, 1977a; MORAES *et al.*, 2000; HOGAN *et al.*, 2015) e o teste de turvação do sulfito de sódio (PFEIFFER; MCGUIRE, 1977; TYLER *et al.*, 1996).

O objetivo dessa revisão é apontar os métodos de avaliação disponíveis para o diagnóstico laboratorial e a campo da Transferência de Imunidade Passiva (TIP) em bezerros. Além de apresentar as vantagens e desvantagens de cada método, afim de possibilitar a escolha daquele que melhor se adequa à pesquisas relacionadas à TIP

2.4. Métodos de avaliação da transferência da imunidade passiva

A Tabela 1 sumariza os métodos de avaliação da Transferência da Imunidade Passiva (TIP). A tabela apresenta a classificação dos métodos pela forma de avaliação da IgG, o princípio de funcionamento, a principal característica, a estatística comparada ao padrão-ouro, o custo do método e a possibilidade de uso deste a campo.

Tabela 1. Métodos de avaliação da Transferência da Imunidade Passiva (TIP). A tabela apresenta a classificação dos métodos pela forma de avaliação da IgG, o princípio de funcionamento, a principal característica, a estatística comparada ao padrão-ouro, o custo do método e a possibilidade de uso deste a campo.

Métodos	Avaliação da IgG	Princípio de funcionamento	Principal característica do método	Estatística comparada ao padrão-ouro	Custo do método	Uso a campo
IDR	Direta	Os anticorpos da amostra de soro se difundem no gel e há formação de um anel de precipitação que possui diâmetro proporcional à concentração de IgG	Padrão-ouro, porém é cara e demorada	-	Muito elevado	Não
Imunoensaios Turbidimétricos	Direta	A amostra é adicionada ao dispositivo e o atravessa a membrana até as zonas de reação onde deverá formar um imunocomplexo (linha). A linha do teste formada é comparada à linha de referência.	Rápido, não requer reagentes, mas é caro	$R^2 = 0,98$, Alley, Haines e Smith (2012)	Elevado	Sim
ELISA	Direta	Teste imunoenzimático semiquantitativo da concentração de imunoglobulinas	Demorado e muitas vezes necessita repetição	$R^2 = 0,97$, Dunn et al. (2018)	Elevado	Não
Eletroforese	Direta	Baseado no movimento das moléculas de proteínas carregadas em um campo elétrico	Corriqueiramente usada para o fracionamento de proteínas do soro	Acurácia de 89%, Pfeiffer et al., 1977a	Moderado	Não
Método Espectroscópico	Direta	Quantifica uma dada molécula em relação à absorvância da luz na amostra pela qual ela está atravessando	Medição simples e rápida e requer pouca ou nenhuma preparação da amostra	$r = 0,93$, Elsohaby et al., 2015	Muito elevado	Ainda não
STIGA	Direta	Utiliza a enzima glicolítica Trealase dividida em dois fragmentos não funcionais fundidos à proteína estreptocócica G para se ligar à IgG	Elevado potencial para ser uma análise direta da IgG em bezerros para uso a campo	$R^2 = 0,83$ à $0,94$, Drikk et al. (2018)	Ainda não disponível comercialmente	Ainda não
Análise bioquímica das proteínas totais e frações	Indireta	Análise colorimétrica de reações bioquímicas com biureto para avaliar proteína total e verde de bromocresol para avaliar albumina. As globulinas são calculadas pela diferença entre a albumina e as proteínas totais.	Altamente difundida nos laboratórios e barata	$r = 0,83$, Santos et al. (2013)	Baixo	Ainda não
Análise bioquímica da GGT Sérica	-	Determina a concentração catalítica da enzima presente na amostra a partir da velocidade de formação do 5-amino-2-nitrobenzoato, medido no espectrofotômetro	Avalia apenas a ingestão de colostro materno não pasteurizado	$r = 0,57$, Hogan et al. (2015)	Baixo	Ainda não
PT por refratometria	Indireta	O refratômetro óptico ou digital de Brix mede a quantidade de luz que é refratada devido aos constituintes da amostra de soro	Barata, simples, rápida e pode ser usada na própria fazenda	$r = 0,93$, Deelen et al.; (2014b); $r = 0,41$, Quigley (2001a)	Baixo	Sim
Refratômetro de Brix	Indireta	O refratômetro óptico ou digital de Brix mede a quantidade de luz que é refratada devido aos constituintes da amostra de soro. O Brix mede a concentração de sacarose em líquidos, mas quando usado em líquidos não contendo sacarose, se aproxima da porcentagem total de sólidos	Usado a campo para avaliar tanto TIP, quanto qualidade do colostro	$r = 0,93$, Deelen et al.	Baixo	Sim
Teste de turvação do sulfato de zinco	Indireta	Prepara-se uma solução de Sulfato de Zinco, adiciona-se a amostra e avalia-se a turvação visualmente ou por espectrofotometria	Barata, simples, rápida e pode ser usada na própria fazenda	$R^2 = 0,78$, Dunn et al. (2018)	Baixo	Sim
Teste de turvação do sulfato de sódio	Indireta	Prepara-se três soluções de Sulfato de Sódio, adiciona-se a amostra e avalia-se a turvação das soluções visualmente. Considera-se que houve adequada TIP quando as três soluções turvam	Barata, simples, rápida e pode ser usada na própria fazenda	Acurácia de 88%, Lee et al. (2008)	Baixo	Sim

IDR: Imunodifusão Radial; IgG: Imunoglobulina G; ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática; STIGA: Split Trehalase IgG Assay; GGT: Gama Glutamilttransferase; TIP: Transferência de Imunidade Passiva.

2.4.1. Métodos diretos

2.4.1.1. *Imunodifusão Radial*

O teste de Imunodifusão Radial (IDR) é um teste de detecção direta da imunoglobulina G e, por isso, é considerado o padrão-ouro, ou seja, é o teste de referência que serve de comparação com os demais testes, para confirmação de Falha na Transferência da Imunidade Passiva (FTIP) (WEAVER *et al.*, 2000; GODDEN, 2008). De um modo geral, em estudos que compara outros métodos de avaliação da TIP com a IDR utilizam os resultados da concentração de IgG da IDR como verdadeiros positivos/negativos para o cálculo da Sensibilidade e Especificidade do método. Desse modo, a Sensibilidade é definida nos estudos como a proporção de bezerros com concentração de IgG menor que 1,0 g/dL no método em relação aos bezerros com concentração de IgG menor que 1,0 g/dL na IDR e a Especificidade é definida como a proporção de bezerros com concentração de IgG maior que 1,0 g/dL no método em relação aos bezerros com concentração de IgG maior que 1,0 g/dL na IDR.

No entanto, por ser realizado em laboratório, ser relativamente caro e requerer um mínimo de 18 a 24 horas para obtenção dos resultados, sua utilização não é recomendada como forma de monitoramento rotineiro na fazenda para avaliação da transferência de imunidade e vem sendo questionada como padrão-ouro (DEELEN *et al.*, 2014; ELSOHABY; MCCLURE; KEEFE, 2015), sendo, portanto, mais recomendado para investigação de surtos de mortalidade relacionados com a falha na transferência de imunidade passiva e realização de pesquisas (GODDEN, 2008).

A IDR foi desenvolvida por Mancini, Carbonara e Heremans, no ano de 1965 com a finalidade de determinar a concentração de um determinado antígeno ou anticorpo em uma amostra desconhecida. Posteriormente, a técnica foi utilizada para dosar imunoglobulina G no colostro e soro de bovinos e avaliar a Transferência de Imunidade Passiva (TIP) em bezerros (PENHALE; CHRISTIE, 1969; PENHALE *et al.*, 1970; PFEIFFER *et al.*, 1977c; FLEENOR; STOTT, 1981; BURTON *et al.*, 1989). Desde então, a IDR é considerada a técnica padrão-ouro para o diagnóstico da FTIP em bezerros (WEAVER *et al.*, 2000; GODDEN, 2008). Os estudos que comparam técnicas com a IDR para o diagnóstico da FTIP definem sensibilidade como a proporção de bezerros com FTPI (<1,0 g/dL) que foram corretamente identificados

como tal, e especificidade como a proporção de bezerros sem FTPI ($\geq 1,0$ g/dL) que foram corretamente identificados como tal (ELSOHABY *et al.*, 2019b).

A IDR é realizada segundo a técnica descrita por Mancini *et al.* (1965). O gel de agarose da placa comercializada possui o antissoro específico para IgG bovina. Nesta placa, 3 μ L da amostra de soro e do controle são depositados em poços distintos. Os antígenos da amostra de soro e do controle se difundem no gel e, após 18-24 horas, se forma um anel de precipitação que possui diâmetro proporcional à concentração de imunoglobulina G. Uma curva padrão deve ser desenhada ou a concentração deve ser calculada a partir do diâmetro obtido (AMERI; WILKERSON, 2008). Tecnicamente, o teste apresenta limitações relacionados com amostras de soro que apresentam diâmetros muito grandes ou muito pequenos. Contudo, nestes casos é possível diluir ou concentrar a amostra de soro, respectivamente, e repetir o exame (FEINBERG, 1998). Além disso, a técnica da IDR demanda mão-de-obra especializada para sua realização e utiliza reagentes e anticorpos com prazo de validade limitados (ELSOHABY; KEEFE, 2015). Em estudo realizado por Alley, Haines e Smith (2012), o coeficiente de variação da imunodifusão radial foi de 47,1%, alto para um teste considerado padrão-ouro.

Foi realizado um estudo comparando dois testes comerciais de IDR, avaliando 30 amostras de sangue coletadas de bezerros holandeses recém-nascidos ao nascimento e 24 horas após a ingestão de colostro, um soro bovino comercial como referência e dois purificados de IgG bovina de diferentes concentrações (AMERI; WILKERSON, 2008). Os autores mostraram um alto nível de discrepância e pouca concordância entre os dois kits de IDR. Embora os kits tenham apresentado elevado coeficiente de correlação ($r=0,84$), a análise de concordância entre os dois testes revelou média de -140,9 (-344,9 a 63,0; 95% IC) com limites de concordância variando entre -1042,5 (-1396,4 a -688,5; 95% IC) a 760,6 (406,7 a 1114,6; 95% IC). O estudo de precisão entre ensaios revelou coeficientes de variação entre as séries mais baixos para o kit VET-RID® em comparação com o kit SRID®. Além disso, o kit VET-RID® se aproximou mais das concentrações esperadas dos purificados de IgG bovinos, enquanto o kit SRID® superestimou a concentração dos purificados de IgG bovinos. Concluiu-se que as diferenças entre os kits de IDR pode ser devido a inacurácia nos padrões internos dos kits.

Desse modo, diversos grupos científicos estão pesquisando outras formas de avaliar a IgG bovina direta, a fim de substituir a técnica de IDR como padrão-ouro para a determinação da FTIP e serão discutidas a seguir.

2.4.1.2. Imunoensaios Turbidimétricos

Em 1997, Etzel, Strohbehn e Mcvicker desenvolveram um imunoensaio para detectar concentrações de IgG no soro ou plasma de bezerros. O teste desenvolvido levava aproximadamente 10 minutos para determinar a concentração de IgG, por leitura da absorbância em espectrofotômetro com filtro de 340nm. Posteriormente, foi produzido um teste rápido baseado nesse imunoensaio, que se encontra disponível comercialmente em duas versões, sendo que uma delas avalia semi-quantitativamente a transferência de imunidade passiva e outra avalia quantitativamente a concentração de IgG. O teste semiquantitativo (ZAPvet Bovine IgG test, NOWDiagnostics, Toronto, Ontario, Canada) foi desenvolvido usando calibradores com concentrações determinadas por turbidimetria. O mesmo utiliza duas linhas visuais, uma linha de teste e uma linha de referência e determina a concentração de IgG bovina usando amostras de sangue total, plasma ou soro. Para a realização do teste, utiliza-se 35-40µL de soro não diluído, que é adicionado à zona de aplicação da amostra. O teste deve ser mantido em uma superfície plana e incubado em temperatura ambiente por 15 a 20 minutos e, em seguida, deve ser lido comparando a intensidade da linha de teste com a linha de referência (ELSOHABY; KEEFE, 2015).

Utilizando 202 amostras de soro de bezerros de 1 a 11 dias de idade, Elsohaby e Keefe (2015) encontraram sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos do teste ZAPvet de 82%, 65%, 47% e 91%, respectivamente. Esses resultados indicam que uma proporção elevada de bezerros é erroneamente classificada como apresentando FTIP, sendo falso-positivos, o que poderia resultar em intervenções desnecessárias em animais que apresentam boa imunidade passiva. Confirmando esse resultado, Renaud *et al.* (2018), comparando os resultados de 149 bezerros holandeses utilizando o mesmo teste rápido e a IDR observaram sensibilidade de 77% e especificidade de 44%. Os autores atribuem esse resultado às discretas mudanças na intensidade da linha teste quando comparada à linha de referência e à dificuldade de depositar a quantidade correta de amostra na zona de

aplicação. Embora o teste seja rápido e não requeira instrumentos, reagentes ou tampões, o que favoreceria seu uso, seus resultados não são muito interessantes para utilização em fazendas. Além disso, o valor de U\$5,00 para cada teste pode torná-lo inviável.

Para a realização do teste, 10µL de soro são adicionados a cada frasco de reagente usando a pipeta calibrada fornecida com o kit, à temperatura ambiente. Após um período de incubação de 5 a 10 minutos, o analisador portátil é inserido no frasco de reagente e a concentração de IgG é imediatamente lida com o auxílio de um analisador portátil (MBC QTII; Midland BioProducts Corp.) ou aplicativo de celular (IgG Smartstrips; Bio-X Diagnostics S.A. Rochefort, Belgium). As amostras de soro com concentrações de IgG superiores à 1.750 mg/dL precisam ser diluídas (1:2) com solução salina e executadas novamente. Alley, Haines e Smith (2012) observaram coeficiente de variação da técnica de Imunoensaio turbidimétrico similar ao da IDR (47,2% e 47,1% respectivamente) e o coeficiente de correlação foi de 0,988 entre as duas técnicas. Além disso, o teste T indicou que não há diferença estatística entre as técnicas.

Devido a elevada precisão, a portabilidade e simplicidade da análise e ao fato de não ser afetado pela condição de hidratação do bezerro, o imunoensaio turbidimétrico qualitativo é bastante prático e poderia ser empregado como forma de avaliação direta da IgG e no monitoramento da TIP em bezerros em fazendas, pois os próprios funcionários poderiam realizá-lo, mediante treinamento. Entretanto, o custo da técnica é um fator limitante (\$7 por teste), de modo que, nos dias atuais, é considerado economicamente inviável (ALLEY; HAINES; SMITH, 2012).

2.4.1.3. Ensaio De Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é um teste semiquantitativo da concentração de imunoglobulinas. Assim como o teste de Imunodifusão Radial, o ELISA é um teste laboratorial e apresenta as mesmas limitações práticas, embora seja mais barato devido à sua maior disponibilidade comparado ao teste de Imunodifusão Radial (GELSINGER *et al.*, 2015).

Lee *et al.* (2008), avaliando 115 bezerros de 0 a 10 dias de idade, observou concordância de 94% entre os resultados obtidos da IDR e do ELISA, área abaixo da

curva de 0,98, sensibilidade de 0,98 e especificidade de 0,91. Já Gelsinger *et al.* (2015), avaliando 104 amostras de sangue de bezerros de corte obtidas 48 horas após o nascimento, observaram que o teste ELISA apresentou valores consistentemente mais baixos que o teste de Imunodifusão Radial. Segundo os autores, esta grande variação pode ser inerente ao teste ELISA, uma vez que, sua metodologia, exige a realização de várias diluições, ao passo que o teste de Imunodifusão Radial requer uma diluição mínima da amostra. Além disso, uma grande proporção das amostras requereu repetição das análises quando testadas com ELISA comparado com teste de Imunodifusão Radial. De modo similar, Dunn *et al.* (2018), analisando 10 amostras de soro de bezerros de leite e de corte, também obtidas 48 horas após o nascimento, observaram que, embora houvesse elevada correlação entre as técnicas de IDR e ELISA ($R^2 = 0.97$; $P < .001$), em média, os valores de IgG determinados pela IDR foram 1,8 maiores que os valores determinados pelo ELISA, provocando erro na classificação dos bezerros em relação à TIP.

Devido às complicações relacionadas à técnica ELISA para a determinação da concentração da IgG bovina, este exame não apresenta muitas recomendações de uso.

2.4.1.4. Eletroforese

A eletroforese é a técnica analítica mais comumente empregada para o fracionamento das proteínas do soro em laboratório. A técnica foi desenvolvida primeiramente por Tiselius (Tiselius, 1937 *apud* KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008) e, desde então, várias modificações já foram realizadas utilizando os seus princípios.

A eletroforese é baseada no movimento das moléculas de proteína carregadas em um campo elétrico (PFEIFFER *et al.*, 1977a; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). A albumina apresenta cargas majoritariamente negativas, além de ser uma molécula pequena, desse modo é uma das proteínas mais móveis no gel de eletroforese, movendo-se no sentido do anodo. Já as imunoglobulinas, especialmente as gamaglobulinas, apresentam as menores quantidades de cargas negativas e migram mais lentamente. Após a corrida no gel, é possível quantificar, então, as proteínas em um eletroforetograma e, assim, determinar as concentrações de cada fração de proteína da amostra de soro ou plasma analisadas (HAY; WESTWOOD, 2002).

Esse método apresenta boa acurácia para a avaliação da IgG (89% a 97%) (PFEIFFER *et al.*, 1977a; RUMBAUGH *et al.*, 1978; MASSIMINI *et al.*, 2006), quando comparado com a IDR e vem sendo empregado na avaliação da TIP em bezerros substituindo a técnica padrão-ouro (LORA *et al.*, 2019).

2.4.1.5. Método Espectroscópico De Infravermelho Por Transmissão e Por Refletância Total Atenuada (ATR)

A espectroscopia de infravermelho (em inglês, *InfraRed* - IR) é uma das ferramentas mais importantes da química analítica moderna usada para análises quantitativas e qualitativas de muitos tipos de amostras. As técnicas baseadas em IR obedecem aos princípios da lei de Lambert Beer, permitindo a quantificação de uma dada molécula em relação à absorvância da luz na amostra pela qual ela está atravessando. Isso permite que a espectroscopia quantifique concentrações específicas de biomoléculas, pois a proporção de luz absorvida pela amostra se correlaciona com a concentração de moléculas dessa amostra (SPALDING *et al.*, 2018).

Existem dois métodos de análise de espectros de IR, a transmissão e a refletância total atenuada (em inglês, *Attenuated Total Reflectance* - ATR). No primeiro método, a amostra é diretamente colocada no caminho do feixe de infravermelho e, em seguida, a energia transmitida é medida e um espectro é gerado. A espectroscopia IR de transmissão, em combinação com regressão de mínimos quadrados parciais, tem sido usada para medir proteínas séricas totais, glicose, albumina, triglicérides, colesterol e ureia em amostras de soro humano e para análise de nutrientes do leite e triagem de vacas leiteiras para doenças metabólicas, como a cetose (HANSEN *et al.*, 2018), na medicina veterinária. Contudo, esse método exige uma preparação mais complexa da amostra, o que a inviabiliza seu uso a campo. Já no segundo método, as alterações que ocorrem no feixe de infravermelho totalmente refletido internamente após o contato com uma amostra é que são medidos. Ao contrário da espectroscopia no infravermelho de transmissão, a espectroscopia de infravermelho de refletância total (ATR) atenuada por natureza não apresenta problemas associados ao comprimento do caminho óptico ou espessura da amostra. A medição é simples e rápida e requer pouca ou nenhuma preparação da amostra. Por isso, o ATR é mais comumente utilizado abordando vários problemas de diagnóstico clínico em medicina humana e veterinária. Recentemente um modelo menor e mais robusto do

equipamento ATR foi produzido, chamando a atenção para a possibilidade de uso a campo (ELSOHABY *et al.*, 2015).

Para a determinação da concentração de IgG bovina é necessário aquecer a amostra, diluí-la (1:1) e homogeneizá-la. 5µl da amostra diluída devem ser distribuídos uniformemente no elemento ATR do módulo óptico do espectrômetro e secos por uma corrente de ar de um secador de cabelo doméstico, a fim de formar uma película fina da amostra no elemento óptico. Os espectros são coletados na faixa de 4000–650 cm⁻¹ com uma resolução nominal de 8 cm⁻¹ dentro de 3 a 4 minutos. O espectro ATR é coletado e salvo no formato espectro GRAMS (SPC) no programa do equipamento.

A fim de avaliar o ATR-IR como técnica para determinação da concentração de IgG em bezerros para a avaliação da TIP, comparou-se os resultados de 208 amostras de bezerros utilizando essa técnica com a IDR. A sensibilidade da técnica foi de 0,92, a especificidade de 1,0 e o coeficiente de correlação 0,93, sugerindo que a técnica pode ser usada em substituição à técnica padrão-ouro, com a vantagem de ser portátil e rápida, possibilitando a realização da análise no campo (ELSOHABY *et al.*, 2015). Em outro estudo, a acurácia da técnica de ATR-IR foi de 0,93 (ELSOHABY *et al.*, 2016). Posteriormente, outros estudos foram realizados utilizando a técnica de espectroscopia IR para a avaliação da TIP, sendo que um deles, utilizando 217 bezerros de 3 a 10 dias de idade, encontrou uma correlação de 0,92 (ELSOHABY *et al.*, 2019b) e o outro comparou a espectroscopia IR de transmissão com refratômetro BRIX (ponto de corte 8,2% Brix), utilizando 691 amostras de bezerros de 1 a 14 dias de idade (sendo 92% menor que 2 dias de idade), a sensibilidade foi de 0,79 e a especificidade foi de 0,97 (ELSOHABY *et al.*, 2019a). Com estes resultados a técnica poderia ser utilizada em substituição à técnica padrão-ouro. Contudo, o custo do equipamento é um forte limitante da difusão dessa técnica.

2.4.1.6. Teste Da Imunoglobulina G Por Trealase Dividida (STIGA)

O teste de quantificação de IgG pela Trealase Dividida (em inglês, *Split Trehalase IgG Assay* - STIGA) também foi desenvolvido como um teste rápido, para dosar IgG na fazenda (DRIKIC *et al.*, 2018).

O STIGA utiliza a enzima glicolítica Trealase (TreA) (conversora da Trealose em glicose). A TreA é dividida em dois fragmentos não funcionais, a TreAN (N) e TreAC

(C), ambos fundidos à proteína estreptocócica G (pG). A proteína G se liga especificamente à região constante da IgG (Fc) e atua como um sensor para IgG independente da especificidade de ligação ao antígeno. Quando as duas proteínas de fusão são incubadas com amostras contendo IgG (seja ela, colostro ou soro), ambas se ligam a Fc da IgG, levando à dimerização e reativação da TreA. A TreA reativada converte a trealose em glicose, que pode ser quantificada por ensaio colorimétrico ou por glicosímetro e, nesse caso, pode ser lida a campo (DRIKIC *et al.*, 2018).

Em estudo realizado por Drikic *et al.* (2018), o coeficiente de correlação entre a IgG determinada pela IDR e a IgG determinada pelo STIGA por técnica colorimétrica foi de 0,90 para amostras de soro de bezerros de leite e de 0,85 para amostras de bezerros de corte. Já para a análise do STIGA utilizando o glicosímetro, o coeficiente de correlação entre as duas técnicas foi de 0,94 para amostras de soro de bezerros leiteiros e 0,83 para amostras de bezerros de corte. O STIGA apresentou 95% e 75% de chance de identificar corretamente a FTPI nas amostras de soro de bezerro leiteiro e de corte, respectivamente, e apresentou 90% e 94,5% de chance de identificar corretamente a adequada transferência da imunidade passiva em amostras de soro de bezerro leiteiro e de corte, respectivamente. Desse modo, essa técnica tem elevado potencial para ser uma análise direta da IgG em bezerros para uso a campo, contudo até a data, não está disponível comercialmente.

2.4.2. Métodos indiretos

2.4.2.1. Análise bioquímica das proteínas totais e frações

As imunoglobulinas são o maior constituinte da proteína total no sangue de bezerros neonatos, além da albumina. Por isso, a avaliação da proteína total pelo método do biureto é um método indireto usado para avaliação da falha na transferência de imunidade passiva. A concentração sérica de proteína total é determinada em laboratório utilizando um reagente comercial. Os íons Cu^{2+} , em meio alcalino, reagem com as ligações peptídicas das proteínas formando um complexo colorido que apresenta máximo de absorção em 550 nm. A intensidade da cor da reação da amostra de soro com a solução de biureto é proporcional à concentração de proteínas na amostra. Para maior aproximação dos valores das imunoglobulinas, é possível dosar também a Albumina sérica e por diferença determinar as globulinas do animal. Em pH ácido, a Albumina reage com o verde de bromocresol formando um complexo

verde-azulado que é medido em 630 nm. A intensidade da cor da reação da amostra de soro com a solução de verde de bromocresol é proporcional à concentração de albumina na amostra (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

A Proteína Total (PT) do soro é constituída por diversos tipos de proteínas, sendo a Albumina a mais prevalente, constituindo de 35 a 50 % das proteínas do soro. A Albumina é um componente bastante estável na circulação e, em bezerros nos primeiros dias de idade, é observada em concentrações próximas de 2,5 a 3,0 g/dL (BORGES *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2012; ELSOHABY *et al.*, 2019a). Além dela, α -globulinas, β -globulinas e γ -globulinas (IgG, IgA, IgM, IgE e IgD), compõem o restante da proteína total (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). A concentração média de α -globulinas e β -globulinas é de 1,0 g/dL (0,7 a 1,3 g/dL) e 0,6 g/dL (0,5 a 1,0 g/dL), respectivamente (ROSENBERGER, 1993; BORGES *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2012), e essas sofrem variações pequenas quanto à absorção de colostro (TÓTHOVÁ *et al.*, 2016). Burton *et al.* (1989), ao avaliar o perfil de imunoglobulinas (γ -globulinas) de 156 bezerros de 24 a 36 horas de idade pela técnica de IDR específica para IgG, IgA e IgM, observou concentrações médias e desvio-padrão de $1,801 \pm 1,534$ g/dL, $0,11 \pm 0,086$ g/dL e $0,154 \pm 0,132$ g/dL, respectivamente, totalizando uma média de imunoglobulinas de 2,065 g/dL podendo variar entre 0,313 e 3,817 g/gl. A Figura 1 ilustra a proporção de cada fração de proteína observada na eletroforese de bezerros de 2 dias de idade (adaptado de Tóthová *et al.*, 2016).

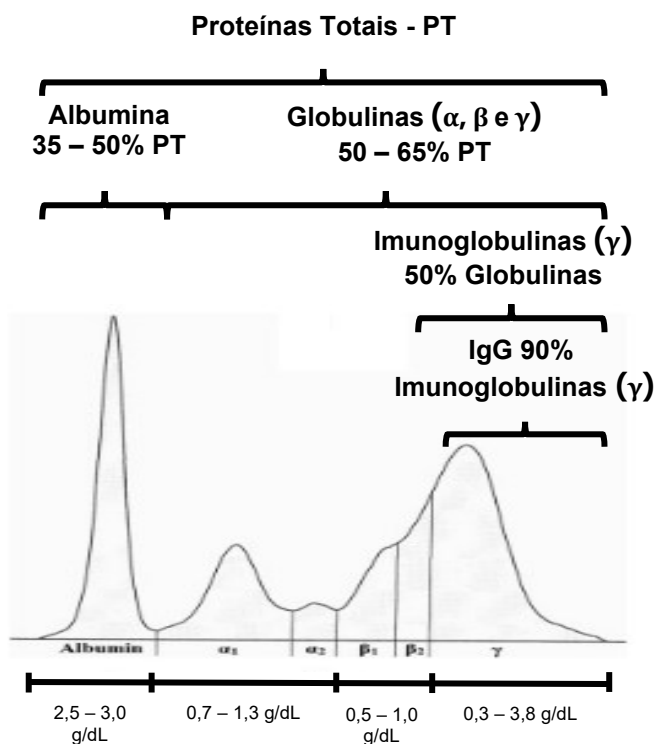


Figura 1: Proporção de cada fração de proteína observada na eletroforese de bezerros aos 2 dias de idade. Adaptado de Tóthová *et al.*, 2016.

Os bezerros podem, portanto, ser classificados de acordo com a sua colostragem como mal colostrados, bem colostrados e excelentemente colostrados, a depender da concentração das imunoglobulinas. A Tabela 2 ilustra, com base em resultados de alguns experimentos, o perfil proteico de bezerros mal colostrados, bem colostrados e excelentemente colostrados. É válido ressaltar que proteínas totais elevadas (superiores à 7,0 g/dL), como demonstrado na Tabela 2, para os bezerros excelentemente colostrados, são relatadas em diversos trabalhos e não estão relacionadas à desidratação, como era acreditado (RENAUD *et al.*, 2018).

Tabela 2. Média e desvio-padrão das concentrações de α -globulinas, β -globulinas, γ -globulinas, albumina e proteína total de bezerros mal colostrados, bem colostrados e excelentemente colostrados.

	Bezerros mal colostrados (Borges <i>et al.</i>, 2001; n=8)	Bezerros bem colostrados (Teixeira <i>et al.</i>, 2012; n=10)	Bezerros excelentemente colostrados (Teixeira <i>et al.</i>, 2012; n=13)
α-globulinas	1,31 \pm 0,22 g/dL	1,03 \pm 0,19 g/dL	1,3 \pm 0,32 g/dL
β-globulinas	0,55 \pm 0,08 g/dL	0,88 \pm 0,19 g/dL	0,99 \pm 0,19 g/dL
γ-globulinas	0,21 \pm 0,09 g/dL	2,02 \pm 1,11 g/dL	4,12 \pm 1,57 g/dL
Albumina	2,79 \pm 0,48 g/dL	2,43 \pm 0,56 g/dL	2,57 \pm 0,62 g/dL
Proteína Total	4,86 \pm 0,7 g/dL	6,45 \pm 1,31 g/dL	8,97 \pm 1,20 g/dL

Modificado de Borges *et al.* (2001) e Teixeira *et al.* (2012).

Uma vez que o bezerro recém-nascido não passou por muitos desafios, que poderiam provocar variações nas demais proteínas, há, nesse indivíduo forte correlação entre a proteína total e as imunoglobulinas absorvidas do colostro, o que permite medir indiretamente a IgG e avaliar a TIP (QUIGLEY, 2001a; TYLER *et al.*, 1996; WILM *et al.*, 2018). Sendo assim, a maior parte dos estudos realiza apenas a PT quando desejam determinar a TIP em bezerros.

Tóthová *et al.* (2016), avaliando o perfil de proteínas por eletroforese de 7 bezerros desde o nascimento até 30 dias de vida, observaram variação nas frações de globulinas entre o dia 0 e o dia 2. Houve diferença estatística entre o dia 0 e o dia 2 para a Proteína Total (4,11 \pm 0,37 g/dL no dia 0 e 8,27 \pm 0,77 g/dL no dia 2; $p < 0,001$), α 1-globulina (1,13 \pm 0,08 g/dL no dia 0 e 1,26 \pm 0,06 g/dL no dia 2; $p < 0,05$), β 2-globulina (0,05 \pm 0,01 g/dL no dia 0 e 0,8 \pm 0,18 g/dL no dia 2; $p < 0,05$) e γ -globulina (0,05 \pm 0,02 g/dL no dia 0 e 2,84 \pm 0,55 g/dL no dia 2; $p < 0,001$), porém não foi observado o mesmo para a Albumina (2,39 \pm 0,3 g/dL no dia 0 e 2,08 \pm 0,16 g/dL no

dia 2; $p > 0,05$), α 2-globulina ($0,14 \pm 0,05$ g/dL no dia 0 e $0,33 \pm 0,05$ g/dL no dia 2; $p > 0,05$) e β 1-globulina ($0,35 \pm 0,08$ g/dL no dia 0 e $0,95 \pm 0,25$ g/dL no dia 2; $p > 0,05$). Feitosa *et al.* (2001) observaram resultados semelhantes, encontrando diferença estatística ($p < 0,05$) entre a Proteína Total, β -globulina e γ -globulina entre bezerros que apresentaram FTIP e que não apresentaram FTIP ($4,71 \pm 0,84$ g/dL e $7,02 \pm 0,96$ g/dL; $0,57 \pm 0,19$ g/dL e $0,93 \pm 0,28$ g/dL e $0,65 \pm 0,50$ g/dL e $2,51 \pm 0,82$ g/dL, respectivamente), porém não observaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre a Albumina e α -globulina entre os grupos ($2,52 \pm 0,35$ g/dL e $2,64 \pm 3,35$ g/dL e $0,97 \pm 0,20$ g/dL e $0,94 \pm 0,28$ g/dL, respectivamente).

Sendo assim, há absorção de outras proteínas presentes no colostro, além das imunoglobulinas, e que irão compor o soro do bezerro após a absorção e essas também estão associadas à imunidade do bezerro neonato. Por exemplo, a β 2-globulina apresentou um aumento de 10 vezes e, foi associado pelos autores do trabalho com a absorção de Lactoferrina, um componente bioativo do colostro que possui ação antimicrobiana (GODDEN, 2008; TÓTHOVÁ *et al.*, 2016). Nesse sentido, a utilização das globulinas como padrão-ouro para a TIP parece mais adequado por englobar a totalidade de proteínas que de fato foram absorvidas do colostro e que apresentam função importante na imunidade do bezerro neonato. Além disso, a determinação das proteínas totais e frações está altamente difundida, com alta acurácia entre os laboratórios e pode vir a ser levada ao campo, tornando-a uma ferramenta de monitoramento para a TIP.

Tyler *et al.* (1996), avaliando amostras de 242 bezerros de 1 a 8 dias de idade, demonstraram que uma concentração de proteína sérica de 5,2 g/dL era equivalente a uma concentração de IgG de 1 g/dL. Santos *et al.* (2013) observaram, avaliando amostras de soro de 30 bezerros, que a concentração de IgG ao final do primeiro dia de vida apresentou correlação positiva com a proteína total medida pelo método do biureto ($r = 0,83$, $p < 0,01$). Resultado similar foi observado por Pauletti *et al.* (2003) que encontraram coeficiente de correlação de 0,79 ($P < 0,0001$) entre PT e IgG de 59 bezerros holandeses até os 60 dias de idade. Hogan *et al.* (2015), avaliando diretamente as globulinas, subtraindo os valores de Albumina dos valores de PT, observaram sensibilidade de 100% e especificidade de 84,91% e 94% dos animais corretamente classificados quanto à TIP quando compararam os resultados com a IDR, mostrando que a acurácia de realizar as proteínas totais e frações é mais elevada

para avaliar a TIP em bezerros. Futuramente, dispositivos portáteis e rápidos para a dosagem da proteína total e frações na fazenda poderão ser uma solução de elevada precisão na avaliação da TIP.

Um importante aspecto da dosagem das PT para avaliar a TIP é a idade do bezerro. Quigley (2001a), avaliando o plasma de 72 bezerros de até 9 dias de idade, encontrou valor de regressão de 0,58 para medições de proteínas totais obtidas pelo método de biureto e IgG obtida por imunoenensaio turbidimétrico, significando que os demais 42% da variância da regressão dependem de outras variáveis, como, por exemplo, da idade avançada dos animais avaliados. Nocek, Braund, Warner (1984), avaliando 159 bezerros em diferentes regimes de dieta desde a colostragem até os 45 dias de idade, mostraram que não houve relação ($P > 0,10$) entre a proteína sérica e a IgG no nascimento ($r=0,02$), uma vez que nascem hipogamaglobulinêmico. No entanto, com a ingestão do colostro e o avançar da idade, a correlação apresenta um aumento significativo. Dentro de 12 a 24 horas após o nascimento, uma correlação positiva significativa ($r=0,84$, $P < 0,001$) e igual resultado no dia 4, resultaram da absorção das imunoglobulinas do colostro. Já no dia 11, a correlação se manteve, porém ocorreu uma redução no coeficiente ($r = 0,69$) sugerindo que a idade influencia na determinação da IgG, estando esse fenômeno relacionado ao catabolismo proteico. Burton *et al.* (1989), confirmaram os resultados do estudo anterior avaliando o comportamento das IgG, IgA e IgM por meio da IDR em 156 bezerros holandeses. Nos três isotipos de imunoglobulinas, os autores observaram pico da concentração às 24 a 36 horas de idade, com queda expressiva à terceira semana de idade. Daniele *et al.* (1994), avaliando a proteína total e a albumina sérica de 24 bezerros holandeses do terceiro ao 60º dia de idade, observaram pico de proteína total ao terceiro dia de idade seguido de declínio e estabilização. Em contrapartida, a albumina sérica não variou com a idade dos animais, mantendo-se constante ao longo do estudo, justificando, portanto que a variação no perfil proteico de bezerros está relacionada à ingestão de imunoglobulinas do colostro e seu catabolismo, uma vez que a albumina tende a ser estável nos animais, já que participa de processos de manutenção da pressão osmótica e de transporte de metabólitos, fundamentais à sobrevivência do indivíduo (KANECO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Essa informação é bastante relevante, pois influencia o período necessário de avaliação da TIP na fazenda. Wilm *et al.* (2018), realizando experimento

acompanhando bezerros até 10 dias de idade mostraram que os bezerros podem ser testados com segurança quanto à transferência passiva de imunidade usando concentrações de IgG ou PT até 9 dias de idade, pois, comparado com o valor de IgG ou PT às 24 h (referência do mesmo indivíduo), as concentrações de PT foram correlacionadas nos 2° e 3° dias de idade ($r \geq 0,98$), correlacionadas, mas variáveis do 4° a 9° dia de idade ($r \geq 0,88$) e menores no 10° dia de idade ($r = 0,76$). No entanto, os próprios autores advertem que todos os indivíduos avaliados se mantiveram saudáveis ao longo do estudo e nenhum apresentava FTIP, não refletindo, portanto, a realidade da maioria das fazendas, sendo necessários mais estudos para confirmar se estes resultados também são válidos para bezerros que adoecem nas primeiras semanas de idade e/ou apresentam FTIP.

Assim, a fim de se obter uma informação mais segura sobre a FTIP, o ideal é realizar a coleta da amostra de soro de 24 à 48 horas de idade, manejo esse que já vem sendo implementado de forma rotineira em diversas fazendas como forma de monitoramento da TIP e da colostragem dos animais (SHIVLEY *et al.*, 2018).

2.4.2.2. Análise bioquímica da Gama Glutamiltransferase (GGT) sérica

Os ductos da glândula mamária produzem elevadas quantidades da enzima Gama Glutamiltransferase (GGT) durante a colostrogênese (síntese do colostro), sendo encontradas concentrações de 30.540 U/L no colostro. Com o passar dos dias, a quantidade de GGT no leite vai decaindo, até chegar em concentrações de 3.120 U/L no leite (sétima ordenha após a ordenha do colostro) (BLUM; HAMMON, 2000). Quando o bezerro ingere o colostro, a GGT é absorvida e sua atividade pode ser detectada no soro. As atividades séricas de GGT em bezerros que ingeriram o colostro são 60-160 vezes maiores do que em bovinos adultos saudáveis (GÜNGÖR; BASTAN; ERBIL, 2004). Desse modo, a GGT sérica do bezerro pode ser utilizada para avaliar se houve ingestão do colostro.

A GGT catalisa a transferência do grupo glutamila da L-gama-glutamila-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina, originando L-gama-glutamilglicilglicina e 5-amino-2-nitrobenzoato, podendo ser determinadas em laboratório, utilizando espectrofotômetro. A concentração catalítica da enzima presente na amostra é determinada a partir da velocidade de formação do 5-amino-2-nitrobenzoato, medido em 405nm (HOGAN *et al.*, 2015).

Hogan *et al.* (2015), utilizando 126 amostras de soro de bezerros de 48 horas e ponto de corte da GGT de 100 IU/L, comparando os valores de GGT com os valores observados na IDR, observaram sensibilidade de 97,26% e especificidade de 98,11% (ponto de corte para FTIP de 1,0 g/dL de IgG na IDR) e 98% dos animais foram corretamente classificados quanto à TIP. Já Güngör Bastan e Erbil (2004) avaliando amostras de soro de 40 bezerros de 1 dia de idade, observaram uma correlação positiva significativa ($P < 0,05$), porém moderada, entre as concentrações séricas de IgG obtidas por Imunodifusão Radial e as atividades séricas de GGT ($r = 0,566$), indicando grandes variações entre os estudos.

Estes resultados possivelmente estão associados à qualidade do colostro fornecido aos bezerros, porque a concentração de GGT no colostro não apresenta nenhuma relação com a concentração de IgG no colostro, de modo que o bezerro apresentar concentração de GGT sérica elevada, não significa que ele ingeriu um colostro de boa qualidade, apenas que houve a ingestão do colostro. Assim, a interpretação mais adequada para o teste é que a GGT sérica indica a ingestão de colostro, não permitindo uma avaliação precisa da concentração sérica de IgG e, conseqüentemente, não fornece uma informação direta da transferência de imunidade passiva (WEAVER *et al.*, 2000). A dosagem da GGT sérica do bezerro pode ser utilizada estrategicamente na identificação de falhas na colostragem, quando se deseja saber se, de fato, o bezerro está recebendo o colostro ou quando se deseja confirmar se os bezerros estão mamando nas mães, nas fazendas onde os partos não são assistidos (gado de corte, por exemplo). No entanto, bezerros que ingerem substituto de colostro ou colostro que passa por tratamento térmico (pasteurização) não apresentam GGT sérico, pois não ingerem GGT, uma vez que esta enzima não é um componente do substituto de colostro e desnatura durante o processamento térmico, tornando este método inadequado para a avaliação da ingestão de colostro nestes casos (WEAVER *et al.*, 2000).

2.4.2.3. Proteína por refratometria

O refratômetro óptico ou digital de proteína mede a quantidade de luz que é refratada devido aos constituintes da amostra de soro. Para tanto, um feixe de luz deve atravessar a amostra de soro depositada no prisma. No soro, as proteínas farão com que a luz se refrate. Quanto maior o teor de proteínas, mais luz é refratada (QUIGLEY,

2001a). Para a leitura por refratometria da proteína, utiliza-se aproximadamente 100µL de soro ou plasma. O valor de proteína total do soro (g/dL) é lido na linha entre as áreas claras e escuras que aparecem na escala do refratômetro óptico ou é mostrado diretamente na tela do refratômetro digital. O uso de refratômetro é baseado no fato de baixas concentrações de proteína total estarem associados à FTIP, uma vez que as Ig são as classes de proteína total que aumentam consideravelmente com a ingestão do colostro (PFEIFFER *et al.*, 1977).

O uso do refratômetro manual tem muitas vantagens dentro do monitoramento do manejo de colostragem, uma vez que é uma ferramenta barata, simples, rápida e pode ser usada na própria fazenda (GODDEN, 2008). Contudo, é necessária cautela na sua interpretação, pois fatores como a qualidade do instrumento, sua manutenção e calibração, temperatura da amostra, idade e estado de hidratação do bezerro podem comprometer o resultado (WEAVER *et al.*, 2000; QUIGLEY, 2001a).

Concentrações séricas de proteína total $\geq 5,2$ g/dL em bezerros saudáveis e bem hidratados ou $\geq 5,5$ g/dL em bezerros clinicamente doentes são consideradas uma avaliação razoavelmente precisa da transferência de imunidade em bezerros (TYLER *et al.*, 1998; WEAVER *et al.*, 2000). Segundo metanálise, Buczinski *et al.* (2018), revisando estudos envolvendo refratômetros de PT concluíram que para minimizar o número de casos falso-negativos (ou seja, o número de bezerros com FTIP não detectado pelo teste), um ponto de corte de 5,5 g/dL em vez de 5,2 g/dL para refratometria parece ser um limiar melhor por descartar a FTIP. Elsohaby *et al.* (2019b), realizando estudo com 217 bezerros de 3 a 10 dias de idade para determinar o ponto de corte do soro e do plasma encontraram pontos de corte de 5,1 g/dL e 5,8 g/dL, respectivamente. Desse modo, a análise pode ser feita com as duas amostras desde que seja adequado o ponto de corte para a análise da TIP. O ponto de corte também pode ser ajustado na fazenda, a fim de melhorar os parâmetros da colostragem e evitar falhas associadas à erros dos equipamentos.

Em um estudo com 185 bezerros, a proteína sérica total teve uma boa correlação com a concentração sérica de IgG utilizando Imunodifusão Radial ($R^2=0,72$) (GODDEN, 2008). Deelen *et al.* (2014b), avaliando 400 amostras de soro de bezerros com 3 a 6 dias de idade, observaram alta correlação entre a proteína total sérica obtida por refratômetro óptico e a IgG dosada por Imunodifusão Radial ($r = 0,93$). Lee *et al.*

(2008), avaliando 115 amostras de soro de bezerros de 0 a 10 dias de idade, observaram sensibilidade de 73% e especificidade de 78%, utilizando os pontos de corte de 5,8 g/dL para a proteína total no refratômetro e 1,0 g/dL de IgG na IDR. Já Quigley (2001a), avaliando o plasma de 72 bezerros de até 9 dias de idade, observou correlação de 0,92 entre as medições de proteínas totais feitas com o refratômetro óptico e a proteína total obtida pelo método de biureto, porém, ao comparar o IgG plasmático por imunensaio turbidimétrico e as proteínas totais pela refratometria observou uma regressão de apenas 0,41, o que indica que 59% da variância da regressão não depende das variáveis estudadas. O autor considera como causas da baixa relação, fatores como a acurácia da técnica de refratometria óptica e a idade dos animais. O refratômetro óptico não é preciso o suficiente para determinar as diferenças, sendo que a maioria dos refratômetros tem precisão de 0,2 g/dL. Isto significa que não é muito efetivo em distinguir entre 5,0 e 5,2 g/dL, por exemplo, o que pode provocar problemas na detecção de falha na transferência de imunidade passiva.

Objetivando melhorar o nível de confiança da técnica de refratometria, autores recomendaram que a eficiência do programa de colostragem seja determinada pela medição da proteína total do soro de amostras de 12 bezerros com 1 a 7 dias de idade. Duas metas são recomendadas: (1) 90% dos bezerros amostrados com valores totais de proteínas $\geq 5,2$ g/dL ou (2) 80% dos bezerros tenham valores de proteínas totais $\geq 5,5$ g/dL (MCGUIRK; COLLINS, 2004; DAIRY AND HEIFER ASSOCIATION, 2016).

2.4.2.4. Refratômetro de BRIX

Assim como os refratômetros comuns, os refratômetros Brix (digital ou óptico) determinam o escore Brix do soro por um feixe de luz que atravessa a amostra até o prisma, medindo o índice de refração e apresentam a leitura numa escala (% Brix). O refratômetro Brix mede a concentração de sacarose em líquidos, como suco de frutas, melão e vinho. No entanto, quando usado em líquidos não contendo sacarose, a porcentagem Brix (% Brix) se aproxima da porcentagem total de sólidos (QUIGLEY, 2016). É uma ferramenta extremamente útil na prática, pois, além de ser usado na avaliação da transferência de imunidade, pode ser utilizado também para avaliar a qualidade do colostro, permitindo monitoramento de dois pontos do manejo da

colostragem com um único equipamento (BIELMANN *et al.*, 2010; DEELEN *et al.*, 2014), sendo, portanto, a técnica mais recomendada atualmente a campo.

Morrill *et al.* (2013), avaliando soro de 200 bezerros de um dia, sugeriram 7,8% Brix como ponto de corte na identificação da falha na transferência de imunidade passiva. Elsohaby *et al.* (2019a) sugeriram 8,3% como ponto de corte, após avaliar 691 bezerros com idades de 1 a 14 dias, sendo que 92% destes apresentavam idade inferior a dois dias. Já Deelen *et al.*, (2014b), avaliando 400 amostras de soro de bezerros com 3 a 6 dias de idade, observaram uma combinação ideal de sensibilidade (88,9%) e especificidade (88,9%) para o valor de 8,4% Brix. Além disso, obtiveram alta correlação entre o refratômetro digital de Brix e a IgG dosada por IDR ($r = 0,93$) e, também, entre o refratômetro digital de Brix e a proteína total sérica obtida por refratômetro óptico ($r = 1,00$) (THORNHILL; KREBS; PETZEL, 2015) analisando amostras de 48 bezerros de 2 dias de idade, determinaram ponto de corte de 10%, tanto no refratômetro óptico Brix quanto no digital Brix. As possíveis razões para essas diferenças podem estar relacionadas ao uso de refratômetros de diferentes fabricantes, bem como a idade, raça e estado de saúde dos bezerros envolvidos nos estudos (ELSOHABY *et al.*, 2019a). Essa grande variação entre os pontos de corte geram uma incerteza no uso desse equipamento mas, ainda assim, é a ferramenta mais utilizada a campo para monitorar a TIP devido a sua rapidez, facilidade de uso e baixo custo (GODDEN, 2008; CONSTABLE *et al.*, 2016).

Para avaliar a qualidade do colostro, determinou-se o ponto de corte de 22% Brix tanto para o refratômetro óptico quanto para o refratômetro digital, pois apresentaram sensibilidades de 88,7% e 91,1% e especificidade de 75% e 91,7% para novilhas e vacas, respectivamente, no refratômetro óptico Brix e sensibilidades de 90,1% e 37,5% e especificidade de 92,2% e 83,3% para novilhas e vacas, respectivamente, no refratômetro digital Brix (BIELMANN *et al.*, 2010).

2.4.2.5. Teste de turvação do sulfato de zinco

Para realizar o teste de turvação do sulfato de zinco, prepara-se uma solução contendo 208mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O/L$ com água destilada, que deve ser fervida para remover o dióxido de carbono. Homogeneiza-se 100 μL da amostra com 6mL da solução e, em seguida, é deixado incubar por uma hora. A leitura pode ser através da absorbância, utilizando o filtro de 660nm em um espectrofotômetro, sendo que a

turbidez é convertida em mg de IgG/L, após a produção de uma curva-padrão derivada de amostras com concentrações conhecidas de IgG bovina ou, realizada visualmente (PFEIFFER *et al.*, 1977). A turbidez é definida como a absorvância aparente resultante da redução da transmitância da luz, uma vez que essa é dissipada pelas partículas suspensas do precipitado, podendo, portanto, ser medida por espectrofotometria com qualquer luz visível (PFEIFFER *et al.*, 1977). Já para avaliar visualmente, prepara-se as soluções de sulfato de zinco (ZnSO₄) nas concentrações de 200, 250, 300, 350 e 400mg/L. A solução deve ser utilizada dentro de 24 horas após a preparação e mantida em um recipiente fechado até o uso. Os resultados dos testes são registrados como 0, 1, 2, 3, 4 ou 5, onde 0 equivale à ausência de turbidez em qualquer uma das 5 concentrações; 1 equivale à turbidez apenas na concentração de 400mg/L; 2 equivale à turbidez nas concentrações de 350 e 400 mg/L; 3 equivale à turbidez nas concentrações de 300, 350 e 400 mg/L; 4 equivale à turbidez nas concentrações 250, 300, 350 e 400 mg/L e 5 equivale à turbidez nas cinco concentrações (LEE *et al.*, 2008).

Hogan *et al.* (2015), ao avaliar amostra de soro de 126 animais de 48 horas de idade, observaram sensibilidade de 98,63%, especificidade de 30,19% e 70% dos animais classificados corretamente quanto à TIP. Dunn *et al.* (2018), comparando o teste de turvação do sulfato de zinco em espectrofotômetro com os métodos IDR e ELISA observaram coeficientes de determinação significativos, $R^2=0,78$ e $R^2=0,77$ ($P < 0,001$), respectivamente. Já Lee *et al.* (2008), utilizando a avaliação visual dessa técnica, observaram sensibilidade de 0,68 e especificidade de 0,97, comparando com a IDR (ponto de corte de 1 g/dL) e relataram que o teste de turvação do sulfato de zinco é um dispositivo de triagem útil, mostrando alta especificidade, mas recomendam o diagnóstico confirmatório da concentração de IgG com uma medida direta, como a IDR. Pfeiffer *et al.* (1977) discutiram que o teste de turvação do sulfato de zinco é fácil de ser realizado e barato, porém é afetado por fatores como hemólise das amostras, tempo e temperatura ambiente da reação e CO₂ atuando na solução de ZnSO₄.

2.4.2.6. Teste de turvação do sulfato de sódio

O ensaio de turbidez de sulfato de sódio foi desenvolvido por Howe (1921) e posteriormente modificado por Campbell e Hanna (1937), Stone e Gitter, (1969) e

Pfeiffer e Mcguire (1977) e apresenta distintas soluções que causam a precipitação seletiva de proteínas de alto peso molecular, incluindo imunoglobulinas (PFEIFFER; MCGUIRE, 1977; STONE; GITTER, 1969). Essa precipitação resulta na turbidez avaliada. Concentrações crescentes de reagente ou solução salina induzem turbidez em concentrações mais baixas de proteínas de alto peso molecular. Conseqüentemente, a turbidez usando uma solução de sulfito de sódio à 14% é indicativa de maiores concentrações séricas de imunoglobulina do que a turbidez de uma solução de 16%. Assim como a turbidez de uma solução de 16% indica maiores concentrações séricas de imunoglobulina do que a turbidez de uma solução de 18% (PFEIFFER; MCGUIRE, 1977).

Para a realização do ensaio de turbidez de sulfito de sódio são preparadas soluções de 14%, 16% e 18% de sulfito de sódio usando água destilada. Para cada amostra de soro, são preparados 3 tubos de ensaio de borossilicato de 13x100 mm contendo 1,9 mL de cada solução. Em seguida, adiciona-se 0,1 mL de soro a cada um dos 3 tubos. Os tubos são misturados e deixados a incubar durante 15 minutos à 23 °C. Para a leitura, observa-se a turvação dos tubos e os mesmos são classificados em escala de cruces: 0, 1+, 2+, 3+; onde 0 é equivalente à ausência de turbidez em todos os 3 tubos, 1+ é equivalente à turbidez observada na solução de sulfito de sódio à 18% apenas, 2+ é equivalente à turbidez observada nas soluções de 16% e 18% apenas, e 3+ equivalente à turbidez observada em todos os 3 tubos (TYLER *et al.*, 1996)

Segundo Howard (1993), a interpretação do resultado é feita da seguinte forma:

- Turvação nos 3 tubos (3+): Concentração de imunoglobulinas G maior que 1500 mg/dL, indicando imunização adequada;
- Turvação nos tubos de 16 e 18% (2+): Concentração de imunoglobulinas G variando de 500 a 1500 mg/dL, indicando falha parcial na transferência de imunidade passiva;
- Turvação apenas no tubo de 18% (1+): Concentração de imunoglobulinas G menor que 500 mg/dL, indicando falha na transferência de imunidade passiva;
- Ausência de turvação nos 3 tubos: Falha na transferência de imunidade passiva.

Tyler *et al.* (1996), avaliando um total de 242 bezerros de 1 a 8 dias de idade, observaram que o ponto de corte do ensaio de turbidez de sulfito de sódio usando as 2 diluições mais baixas, 14% e 16%, corresponde a concentrações de IgG sérica excessivamente altas (neste estudo, 1+, 2+ e 3+ corresponderam à 1250, 2116 e 2948 mg/dL de IgG sérica, respectivamente). Segundo este estudo, o uso de concentrações de solução de teste de 14% ou 16% tende a classificar erroneamente um grande número de bezerros com concentrações adequadas de imunoglobulina sérica como tendo falha na transferência de imunidade passiva. A partir deste estudo, alguns pesquisadores vêm desaconselhando o uso desta técnica como meio de avaliação da transferência da imunidade passiva (WEAVER *et al.*, 2000; GODDEN, 2008;).

Posteriormente, Lee *et al.* (2008) avaliando 115 bezerros de 0 a 10 dias de idade, ao comparar o teste do sulfito de sódio com três tubos (14%, 16% e 18%) ao teste de IDR, considerando 1 g/dL como ponto de corte para a concentração de Ig, observaram área abaixo da curva de 0,88, sensibilidade de 76% e especificidade de 99%, sendo superior às demais técnicas indiretas comparadas no estudo (proteína total por refratometria, coagulação do gluteraldeído e turvação do sulfato de zinco). Além disso, foi elencada como uma das técnicas mais rápidas e mais baratas no estudo, sendo que o tempo máximo para realização foi de uma hora e o custo unitário do teste foi de \$0,57. Vespasiano *et al.*, (2013), modificando a técnica e avaliando a turvação pelo sulfito de sódio nas concentrações de 14%, 15%, 16%, 17% e 18% em 38 bezerros com 2 dias de idade, observaram correlação de 0,67 entre a concentração de IgG por Imunodifusão Radial e o teste de turvação do sulfito de sódio.

O teste de turvação do sulfito de sódio é uma técnica indireta eficaz, rápida, simples e barata para a avaliação da transferência de imunidade passiva a campo e pode ser aprimorada mediante mais estudos.

2.5. Considerações finais

Devido à importância da adequada transferência da imunidade passiva para o bezerro, o monitoramento constante do manejo da colostragem se faz necessário nas fazendas. Vários métodos de análise diretos e indiretos da concentração de IgG sérica estão disponíveis. Avaliando a disponibilidade, rentabilidade e eficiência de cada metodologia, atualmente o refratômetro Brix tem uma maior indicação de uso, devido à sua dupla utilidade na avaliação da colostragem e, futuramente, o Teste da

Imunoglobulina G por Trealase Dividida (STIGA) poderá ser um método interessante para a análise direta de IgG bovina nas fazendas. Contudo, a utilização das globulinas como padrão-ouro para a TIP parece uma opção mais adequada por englobar a totalidade de proteínas que de fato foram absorvidas do colostro e que apresentam função importante na imunidade do bezerro neonato. O ensaio de turbidez do sulfato de sódio também poderá atender bem ao monitoramento da falha de transferência de imunidade passiva, caso as pesquisas avancem no sentido de determinar o melhor ponto de corte para esta técnica, transformando-o em um teste rápido a campo. Futuramente, dispositivos portáteis e rápidos para a dosagem da proteína total e frações na fazenda poderão ser uma solução de elevada precisão na avaliação da TIP.

Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Celular and molecular immunology**. 9 ed ed. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 53
- ABUELO, A. *et al.* An investigation of dairy calf management practices, colostrum quality, failure of transfer of passive immunity, and occurrence of enteropathogens among Australian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 9, 2019.
- ALLEY, M. L.; HAINES, D. M.; SMITH, G. W. Short communication: Evaluation of serum immunoglobulin G concentrations using an automated turbidimetric immunoassay in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4596–4599, 2012.
- AMERI, M.; WILKERSON, M. J. Comparison of two commercial radial immunodiffusion assays for detection of bovine immunoglobulin G in newborn calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 3, p. 333–336, 2008.
- ATKINSON, D. J.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; WEARY, D. M. Benchmarking passive transfer of immunity and growth in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 3773–3782, 2017.
- BEAM, A. L. *et al.* Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3973–3980, 2009.
- BERGE, A. C. B. *et al.* A clinical trial evaluating prophylactic and therapeutic antibiotic use on health and performance of preweaned calves. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 6, p. 2166–2177, 2005.
- BESSI, R. *et al.* Colostral Antibodies Absorption in Calves. II. Distal Small Intestine Study. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2325–2331, 2002.

BIELMANN, V. *et al.* An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3713–3721, 2010.

BLUM, J. W.; HAMMON, H. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. **Livestock Production Science**, v. 66, n. 2, p. 151–159, 2000.

BORGES, A. S. *et al.* Influência da forma de administração e da quantidade fornecida de colostro sobre a concentração de proteína total e de suas frações eletroforéticas no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 629–634, 2001.

BUCZINSKI, S. *et al.* Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Accuracy of Serum Refractometry and Brix Refractometry for the Diagnosis of Inadequate Transfer of Passive Immunity in Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 1, p. 474–483, 2018.

BURTON, J. L. *et al.* Variation in Serum Concentrations of Immunoglobulins G, A, and M in Canadian Holstein-Friesian Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 135–149, 1989.

BUSH, L. J.; STALEY, T. E. Absorption of Colostral Immunoglobulins in Newborn Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 4, p. 672–680, 1980.

BUTLER, J. E. Bovine Immunoglobulins: A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 12, p. 1895–1909, 1969.

BUTLER, J. E. Bovine immunoglobulins: An augmented review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 4, n. 1–2, p. 43–152, 1983.

CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 87–104, 2008.

CHIGERWE, M.; HAGEY, J. V.; ALY, S. S. Determination of neonatal serum immunoglobulin G concentrations associated with mortality during the first 4 months of life in dairy heifer calves. **Journal of Dairy Research**, v. 82, n. 4, p. 400–406, 2015.

CONSTABLE, P. *et al.* **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats - two-volume set**. 11 ed. ed. [s.l.] Saunders Ltd., 2016.

CORTESE, V. S. Neonatal Immunology. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 221–227, 2009.

DAIRY AND HEIFER ASSOCIATION. **Gold Standards - 2^a ed.** [s.l.: s.n.].

DANIELE, C. *et al.* Efeito de diferentes manejos de fornecimento prolongado de colostro sobre os níveis de proteína e albúmina séricas e desempenho de bezerras recém-nascidas. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 2, p. 381–388, 1994.

DAVIS, C. L.; DRACKLEY, J. K. **The development, nutrition, and management of the young calf**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1998.

DEELEN, S. M. *et al.* Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3838–3844, 2014.

DENISE, S. K. *et al.* Effects of Passive Immunity on Subsequent Production in Dairy Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 2, p. 552–554, 1989.

DONOVAN, G. A. *et al.* Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 34, n. 1, p. 31–46, 1998.

DRIKIC, M. *et al.* Determining the IgG concentrations in bovine colostrum and calf sera with a novel enzymatic assay. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2018.

DUNN, A. *et al.* Comparison of single radial immunodiffusion and ELISA for the quantification of immunoglobulin G in bovine colostrum, milk and calf sera. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 523–528, 2018.

ELSOHABY, I. *et al.* A rapid field test for the measurement of bovine serum immunoglobulin G using attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, 2015.

ELSOHABY, I. *et al.* Quantification of bovine immunoglobulin G using transmission and attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 1, p. 30–37, 2016.

ELSOHABY, I. *et al.* Diagnostic performance of direct and indirect methods for assessing failure of transfer of passive immunity in dairy calves using latent class analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 164, n. September 2018, p. 72–77, 2019a.

ELSOHABY, I. *et al.* Using serum and plasma samples to assess failure of transfer of passive immunity in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, 2019b.

ELSOHABY, I.; KEEFE, G. P. Preliminary validation of a calf-side test for diagnosis of failure of transfer of passive immunity in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4754–4761, 2015.

ELSOHABY, I.; MCCLURE, J. T.; KEEFE, G. P. Evaluation of Digital and Optical Refractometers for Assessing Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 721–726, 2015.

ETZEL, L. R.; STROHBEHN, R. E.; MCVICKER, J. K. Development of an automated turbidimetric immunoassay for quantification of bovine serum immunoglobulin G. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 11, p. 1201–1205, 1997.

FEINBERG, G. Single Radial Immunodiffusion. In: **Encyclopedia of Immunology**. [s.l.: s.n.]. p. 1287–1289.

FEITOSA, F. L. F. *et al.* Diagnóstico De Falha De Transferência De Imunidade Passiva Em Bezerros Através Da Determinação De Proteína Total E De Suas Frações Eletroforéticas, Imunoglobulinas G E M E Da Atividade Da Gama Glutamil Transferase No Soro Sangüíneo. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 251–255, 2001.

FLEENOR, W. A.; STOTT, G. H. Single Radial Immunodiffusion Analysis for Quantitation of Colostral Immunoglobulin Concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 5, p. 740–747, 1981.

FURMAN-FRATCZAK, K.; RZASA, A.; STEFANIAK, T. The influence of colostrum immunoglobulin concentration in heifer calves' serum on their health and growth. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5536–5543, 2011.

GELSINGER, S. L. *et al.* 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. 4084–4089, 2015.

GERSHWIN, L. J. Bovine immunoglobulin E. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, n. 1, p. 2–6, 2009.

GODDEN, S. Colostrum Management for Dairy Calves. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 19–39, 2008.

GÜNGÖR, Ö.; BASTAN, A.; ERBİL, M. K. The usefulness of the γ -glutamyltransferase activity and total proteinemia in serum for detection of the failure of immune passive transfer in neonatal calves. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 155, n. 1, p. 27–30, 2004.

HANSEN, M. F. *et al.* Automated monitoring of dairy cow body condition, mobility and weight using a single 3D video capture device. **Computers in Industry**, v. 98, p. 14–22, 2018.

HAY, F. C.; WESTWOOD, O. M. R. **Practical Immunology**. 4. ed. [s.l.] Blackwell Science, 2002. v. 4

HOGAN, I. *et al.* Comparison of rapid laboratory tests for failure of passive transfer in the bovine. **Irish Veterinary Journal**, v. 68, n. 1, 2015.

HOUGH, R. L. *et al.* Influence of nutritional restriction during late gestation on production measures and passive immunity in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 1, p. 142, 1990.

- HOWARD, J. L. **Current veterinary therapy**. 3. ed. [s.l.] WB Saunders Company, 1993.
- KANECO, J. J.; HARVEY, J. W. ; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. [s.l.] Academic Press, 2008.
- LAWRENCE, K. *et al.* Prevalence of failure of passive transfer of maternal antibodies in dairy calves in the Manawatu region of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 65, n. 1, p. 1–5, 2017.
- LEE, S. H. *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Single Radial Immunodiffusion, and Indirect Methods for the Detection of Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 22, p. 212–218, 2008.
- LORA, I. *et al.* Factors associated with passive immunity transfer in dairy calves: Combined effect of delivery time, amount and quality of the first colostrum meal. **Animal**, v. 12, n. 5, p. 1041–1049, 2017.
- LORA, I. *et al.* Association between passive immunity and health status of dairy calves under 30 days of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 152, n. January, p. 12–15, 2018.
- LORA, I. *et al.* Transfer of passive immunity in dairy calves: The effectiveness of providing a supplementary colostrum meal in addition to nursing from the dam. **Animal**, v. 13, n. 11, p. 2621–2629, 2019.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v. 2, n. 3, p. 235–254, 1965.
- MASSIMINI, G. *et al.* Evaluation of assay procedures for prediction of passive transfer status in lambs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 4, p. 593–598, 2006.
- MCGUIRK, S. M.; COLLINS, M. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 3 SPEC. ISS., p. 593–603, 2004.
- MORAES, M. P. *et al.* Relationship between passive immunity and morbidity and weight gain in dairy cattle. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 299–304, 2000.
- MORRILL, K. M. *et al.* Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3997–4005, 2012.
- MORRILL, K. M. *et al.* Estimate of serum immunoglobulin G concentration using refractometry with or without caprylic acid fractionation. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4535–4541, 2013.
- MURPHY, J. M.; HAGEY, J. V.; CHIGERWE, M. Comparison of serum immunoglobulin G half-life in dairy calves fed colostrum, colostrum replacer or administered with intravenous bovine plasma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 158, n. 3–4, p. 233–237, 2014.

NOCEK, J. E.; BRAUND, D. G.; WARNER, R. G. Influence of Neonatal Colostrum Administration, Immunoglobulin, and Continued Feeding of Colostrum on Calf Gain, Health, and Serum Protein. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 2, p. 319–333, 1984.

O'NEILL, J. Book review: Tackling drug-resistant infections globally. **Archives of Pharmacy Practice**, v. 7, n. 3, p. 110, 2016.

OLSON, D. P. *et al.* Effects of maternal nutritional restriction and cold stress on young calves: absorption of colostrum immunoglobulins. **American journal of veterinary research**, v. 42, n. 5, p. 876–880, 1981.

PAULETTI, P. *et al.* Quality of colostrum passive immunity and pattern of serum protein fluctuation in newborn calves. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 3, p. 453–456, 2003.

PENHALE, W. J. *et al.* Quantitative studies on bovine immunoglobulins. II. Plasma immunoglobulin levels in market calves and their relationship to neonatal infection. **The British veterinary journal**, v. 126, n. 1, p. 30–32, 1970.

PENHALE, W. J.; CHRISTIE, G. Quantitative studies on bovine immunoglobulins: I. Adult plasma and colostrum levels. **Research in Veterinary Science**, v. 10, p. 493, 1969.

PETER, A. T. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 693–705, 2013.

PFEIFFER, N. E. *et al.* Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 693–698, 1977.

PFEIFFER, N. E.; MCGUIRE, T. C. Sodium sulfite precipitation test for assessment of colostrum immunoglobulin transfer to calves.pdf. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 8, p. 809–811, 1977.

QUIGLEY, J. **Calf Note # 39 – Using a refractometer**. Disponível em: <<http://calfnotes.com/pdffiles/CN039.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2018a.

QUIGLEY, J. **Calf Note #62 – Calf Age, Total Protein and FPT in Calves**. Disponível em: <<http://www.calfnotes.com/pdffiles/CN062.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2018b.

QUIGLEY, J. Passive Immunity in Newborn Calves Absorption of Immunoglobulins. **Advances in Dairy Technology**, v. 14, p. 273–292, 2002.

QUIGLEY, J. **Calf Note 187 - BRIX Refractometer for serum IgG**. Disponível em: <<https://www.calfnotes.com/pdffiles/CN187.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2018.

QUIGLEY, J. D.; DREWRY, J. J. Nutrient and Immunity Transfer from Cow to Calf Pre- and Postcalving. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 10, p. 2779–2790, 1998.

RABOISSON, D.; TRILLAT, P.; CAHUZAC, C. Failure of passive immune transfer in calves: A meta-analysis on the consequences and assessment of the economic impact. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016.

RENAUD, D. L. *et al.* Short communication: Validation of methods for practically evaluating failed passive transfer of immunity in calves arriving at a veal facility. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9516–9520, 2018.

ROSENBERGER. **Exame clínico dos bovinos**. 3. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 1993.

RUMBAUGH, G. E. *et al.* Measurement of neonatal equine immunoglobulins for assessment of colostrum immunoglobulin transfer: comparison of single radial immunodiffusion with the zinc sulfate turbidity test, serum electrophoresis, refractometry for total serum protein, and the sod. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, p. 321–325, 1978.

SANTOS, G. G. F. *et al.* Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos alimentados com colostro de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 3, p. 188–197, 2013.

SANTOS, R. B.; SILVA, J. M.; BELETTI, M. E. Ultrastructure of bovine placenta during all gestational period. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1376–1384, 2017.

SELMAN, I. E.; MCEWAN, A. D.; FISHER, E. W. Studies on dairy calves allowed to suckle their dams at fixed time post partum. **Research in Veterinary Science**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 1971.

SHIVLEY, C. B. *et al.* Prewaned heifer management on US dairy operations: Part II. Factors associated with colostrum quality and passive transfer status of dairy heifer calves. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9185–9198, 2018.

SILPER, B. F. *et al.* Avaliação da qualidade do colostro e transferência de imunidade passiva em animais mestiços Holandês Zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 281–285, 2012.

SPALDING, K. *et al.* Enabling quantification of protein concentration in human serum biopsies using attenuated total reflectance – Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 99, p. 50–58, 2018.

STELWAGEN, K. *et al.* Immune components of bovine colostrum and milk. **Journal of animal science**, v. 87, n. 13 Suppl, p. 3–9, 2009.

STONE, S. S.; GITTER, M. The validity of the sodium sulphite test for detecting immunoglobulins in

calf sera. **The British veterinary journal**, v. 125, n. 2, p. 68–72, 1969.

SVENSSON, C. *et al.* Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, n. 3–4, p. 179–197, 2003.

TAO, S. *et al.* Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7128–7136, 2012.

TEIXEIRA, W. T. *et al.* Transfer of passive immunity and serum proteinogram in the first six months of life of Criollo lageano and black and white holstein calves. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 980–986, 2012.

THAKUR, S. D.; PANDA, A. K. Rational use of antimicrobials in animal production: A prerequisite to stem the tide of antimicrobial resistance. **Current Science**, v. 113, n. 10, p. 1846–1857, 2017.

THORNHILL, J. B.; KREBS, G. L.; PETZEL, C. E. Evaluation of the Brix refractometer as an on-farm tool for the detection of passive transfer of immunity in dairy calves. **Australian Veterinary Journal**, v. 93, n. 1–2, p. 26–30, 2015.

TÓTHOVÁ, C. *et al.* Changes in the concentrations of serum proteins in calves during the first month of life. **Journal of Applied Animal Research**, v. 44, n. 1, p. 338–346, 2016.

TROTZ-WILLIAMS, L. A.; LESLIE, K. E.; PEREGRINE, A. S. Passive immunity in Ontario dairy calves and investigation of its association with calf management practices. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 10, p. 3840–3849, 2008.

TYLER, J. W. *et al.* Evaluation of 3 Assays for Failure of Passive Transfer in Calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)**, v. 10, n. 5, p. 304–307, 1996.

TYLER, J. W. *et al.* Use of serum protein concentration to predict mortality in mixed-source dairy replacement heifers. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 12, n. 2, p. 79–83, 1998.

VESPASIANO, L. C. *et al.* COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS. **Vet. e Zootec.**, v. 18, n. 4, p. 334–335, 2013.

VOGELS, Z.; CHUCK, G.; MORTON, J. Failure of transfer of passive immunity and agammaglobulinaemia in calves in south-west Victorian dairy herds: Prevalence and risk factors. **Australian Veterinary Journal**, v. 91, n. 4, p. 150–158, 2013.

WEAVER, D. M. *et al.* Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 6, p. 569–577, 2000.

WILM, J. *et al.* Technical note: Serum total protein and immunoglobulin G concentrations in neonatal dairy calves over the first 10 days of age. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 6430–6436, 2018.

WINDEYER, M. C. *et al.* Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 2, p. 231–240, 2014.

YANG, M. *et al.* Colostrum quality affects immune system establishment and intestinal development of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 7153–7163, 2015.

3. CAPÍTULO 2 - PADRONIZAÇÃO DA IMUNODIFUSÃO RADIAL PARA AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS

Padronização da imunodifusão radial para avaliação da transferência de imunidade passiva em bezerros

Radial immunodiffusion standardization for evaluation of transfer of passive immunity in calves

Rayanne Soalheiro de Souza¹, Bruna Lopes Bueno², Marco Túlio Gomes Campos¹, Luana Coeli Araújo Ferreira³, Daiane Maria Cerqueira⁴, Jenner Karlisson Pimenta dos Reis⁵, Fabiola de Oliveira Paes Leme⁶, Tiago Facury Moreira⁶, Elias Jorge Facury Filho⁶.

¹Mestrandos em Ciência Animal na Universidade Federal de Minas Gerais

²Doutoranda em Ciência Animal na Universidade Federal de Minas Gerais

³Graduanda em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Minas Gerais

⁴Departamento de Clínica e Cirurgia da Universidade Federal de Minas Gerais

⁵Professor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais

⁶Professor(a) do Departamento de Clínica e Cirurgia da Universidade Federal de Minas Gerais

3.1. Resumo

A técnica de Imunodifusão Radial é utilizada para quantificar imunoglobulinas e estimar de forma mais aproximada a concentração da imunoglobulina G em soros sanguíneos e outros fluidos biológicos. A Imunodifusão Radial é considerada a técnica padrão-ouro para avaliar a Transferência de Imunidade Passiva em bezerros. O objetivo do presente estudo foi padronizar a técnica de Imunodifusão Radial *in house*, a fim de estimar a concentração de imunoglobulinas em bezerros de 24 a 48 horas de idade e avaliar a ocorrência de Falha na Transferência de Imunidade Passiva em fazendas. A técnica de Imunodifusão Radial padronizada estimou a concentração de

imunoglobulinas, mas não foi eficiente na determinação da concentração da imunoglobulina G de amostras de soro de bezerros para a avaliação da Transferência de Imunidade Passiva. São necessários mais estudos para obter uma pureza mais elevada dos substratos utilizados na técnica e confirmar se as técnicas comerciais de Imunodifusão Radial são capazes de dosar imunoglobulina G de forma específica. Amostras hemolisadas e ictericas interferiram no resultado da técnica de Imunodifusão Radial.

Palavras chave: Padrão-ouro, métodos de análise, bezerro neonato, monitoramento.

3.2. **Abstract**

The Radial Immunodiffusion technique is used to quantify immunoglobulins and by more closely analyzing the concentration of immunoglobulin G. The Radial Immunodiffusion is considered the gold standard technique for assessing Transfer of Passive Immunity in calves. The aim of the present study was to standardize an in-house Radial Immunodiffusion technique to determine 24 to 48-hour-old calf immunoglobulin concentration and to evaluate the prevalence of Failure of Transfer of Passive Immunity in farms. The standardized Radial Immunodiffusion technique estimated the immunoglobulin concentration of calf serum samples and evaluated Transfer of Passive Immunity, but did not specifically measure immunoglobulin G. The hemolyzed and jaundiced samples interfered with the results of the Radial Immunodiffusion technique.

Keywords: Gold standard, analysis methods, newborn calf, monitoring.

3.3. **Introdução**

Também chamadas de anticorpos, as imunoglobulinas são produzidas por plasmócitos e fazem parte da defesa adquirida do hospedeiro contra patógenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018a).

Os bovinos apresentam cinco tipos de imunoglobulinas: IgG (dividida em três subclasses: IgG₁, IgG₂ e IgG₃), IgA e IgM, com concentrações na circulação sanguínea variando entre 1,7 a 2,7 g/dL, 0,25 a 0,4 g/dL e 0,1 a 0,5 g/dL, respectivamente (BUTLER, 1969; KANECO; HARVEY; BRUSS, 2008) e IgE e IgD, cujas concentrações na circulação são extremamente baixas (TIZARD, 2013). As

imunoglobulinas G (IgG) são glicoproteínas cuja estrutura básica é composta por duas cadeias pesadas (H) e duas leves (L) ligadas por pontes de dissulfeto com uma massa molecular de 150 kDa (KANECO; HARVEY; BRUSS, 2008).

A Imunodifusão Radial é a reação imunológica de precipitação na qual os reagentes se difundem através de um meio semissólido, como, por exemplo, o gel de ágar (FEINBERG, 1998). Uma vez que a amostra é depositada em poços feitos no gel, a reação ocorre radialmente em torno do poço e, após um determinado período de tempo, a reação é visualizada, atingindo um ponto máximo de formação do halo de precipitação, bastante distinto, que se mantém constante (HAY; WESTWOOD, 2002). A partir desse ponto, as leituras dos diâmetros do halo podem ser realizadas a qualquer momento (FEINBERG, 1998). O tempo para a formação do halo de precipitação depende do tamanho da molécula do anticorpo, bem como da concentração do mesmo na amostra. Quanto maior a massa molecular da molécula, maior o tempo para a formação completa do halo e menor o halo formado. A área circunscrita pelo halo é proporcional à concentração do anticorpo, desse modo, também é possível correlacionar o diâmetro do halo formado com a concentração do anticorpo, realizando-se uma curva de calibração (HAY; WESTWOOD, 2002).

O tipo de imunodifusão radial realizado no presente estudo foi a imunodifusão radial simples, uma vez que apenas o anticorpo contido na amostra se difundiu pelo gel de ágar impregnado com o anti-IgBov, ao contrário do que ocorre na imunodifusão radial dupla, onde tanto o antígeno quanto o anticorpo são depositados em poços separados feitos no gel para se difundirem e formarem uma linha de precipitação no momento em que se encontram (FEINBERG, 1998). A imunodifusão dupla é uma técnica quantitativa mais utilizada para demonstrar e comparar a presença do antígeno e anticorpo, ao passo que a imunodifusão radial simples é uma técnica semiquantitativa, que permite estimar as concentrações dos antígenos ou anticorpos pesquisados. As técnicas de precipitação de antígeno-anticorpo foram desenvolvidas a vários anos e, desde então, são utilizadas na avaliação qualitativa e quantitativa dos anticorpos. Em 1932, Petri observou a formação de um anel de precipitado em torno de uma colônia de uma bactéria produtora de exotoxina que crescia em ágar que continha a antitoxina específica. Em 1945, Oudin estava transferindo as observações de Petrie para um tubo, mostrando que os anéis de precipitado se formavam em um gel contendo antissoro quando esse fosse coberto com uma solução do antígeno correspondente.

Simultaneamente, em 1949, Ouchterlony e Elek adaptaram independentemente essa observação para produzir a técnica de dupla imunodifusão produzindo poços em uma placa de gel com um cortador e cada poço recebeu antígeno ou anticorpo. À medida que os dois reagentes se difundiram no gel, formou-se a linha do precipitado dentro da zona de sobreposição. Esta se tornou a técnica qualitativa mais útil para demonstrar e comparar antígenos e anticorpos, mas mostrou-se inadequada para determinações quantitativas. Em 1957, Feinberg combinou a difusão simples de tubo de Oudin com a placa Ouchterlony-Elek para produzir um único sistema de imunodifusão radial. Como na técnica de Oudin, o soro foi incorporado em um gel derretido, mas, como em Ouchterlony-Elek, o gel foi depositado em uma placa e deixado repousar. Poços uniformes foram cortados no gel antissoro e preenchidos com solução de antígeno, utilizando concentrações padrão do antígeno para comparação com os antígenos de teste. Em 1963, Tomasi e Zigelbaum modificaram a técnica de Feinberg e mediram os diâmetros dos anéis de precipitado, plotando os resultados contra as concentrações de antígeno. Em 1965, Fahey e McKelvey confirmaram a validade do sistema e o usaram para medir os níveis de imunoglobulinas no soro. No mesmo ano, Mancini, Carbonara e Heremans mediram os níveis de imunoglobulinas no soro em uma diversidade de antígenos. Posteriormente, Vaerman *et al.* (1969) utilizaram a técnica da IDR reversa para dosar anticorpos, invertendo os papéis dos reagentes: o anti-anticorpo (antígeno) foi incorporado ao gel e anticorpos diluídos foram depositados nos poços de ágar das placas.

Em 1969, Penhale e Chistie utilizaram a técnica da IDR para estimar imunoglobulinas no plasma de bezerros e, a partir desse estudo, diversos outros foram realizados utilizando a mesma técnica com o objetivo de determinar a concentração das imunoglobulinas do colostro, bem como a concentração das imunoglobulinas séricas do bezerro a fim de avaliar a Transferência de Imunidade Passiva (TIP) (BURTON *et al.*, 1989; FLEENOR; STOTT, 1981; PFEIFFER *et al.*, 1977; TYLER *et al.*, 1996). Embora forneça apenas uma estimativa semiquantitativa da concentração da imunoglobulina G, a IDR é, ainda, considerada a técnica padrão-ouro para avaliar a TIP em bezerros (GODDEN, 2008; WEAVER *et al.*, 2000).

Contudo, o kit comercial da IDR disponível no Brasil é importado e caro, inviabilizando as pesquisas com TIP, especialmente porque esses estudos normalmente demandam

um n amostral grande e pode ser necessária a repetição das análises (GELSINGER *et al.*, 2015). Existem outras técnicas que dosam diretamente a IgG, como Imunoensaios Turbidimétricos (ALLEY; HAINES; SMITH, 2012; ELSOHABY; KEEFE, 2015), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)(GELSINGER *et al.*, 2015), eletroforese (PFEIFFER *et al.*, 1977), método espectroscópico de infravermelho por Transmissão e por Refletância Total Atenuada (ATR)(ELSOHABY *et al.*, 2015, 2016) e o Teste da Imunoglobulina G por Trealase Dividida (STIGA)(DRIKIC *et al.*, 2018). Contudo, não são amplamente aceitos pelos especialistas no tema como técnica padrão-ouro para avaliar a TIP em bezerros.

O objetivo do presente estudo foi padronizar a técnica de IDR *in house* a fim de utilizá-la em pesquisas envolvendo a TIP, bem como em estudos na comparação com técnicas desenvolvidas para a avaliação da TIP a campo.

3.4. Material e métodos

Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pelo CEUA-UFMG (protocolo n° 308/2019).

3.4.1. Amostras de soro

Foram utilizadas 191 amostras de soro de bezerros de 24 a 48 horas de idade provenientes da soroteca do Laboratório de Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras foram avaliadas em triplicata na Imunodifusão Radial, totalizando 573 resultados válidos. As amostras advinham de fazendas comerciais que solicitavam ao laboratório a dosagem de Proteína Total por refratometria para avaliação indireta da Transferência da Imunidade Passiva (TIP) dos bezerros e realizavam este monitoramento de forma rotineira. Das 191 amostras de soros de bezerros de 24 a 48 horas de idade analisadas pela técnica de Imunodifusão Radial, padronizada no presente estudo, 70 advinham de uma fazenda localizada no estado de Goiás, 94 de uma fazenda localizada no estado do Paraná e as demais 27 amostras advinham de fazendas do estado de Minas Gerais, porém não constituíam amostra representativa de suas fazendas. As características das amostras quanto à lipemia, hemólise e icterícia foram registradas segundo os seguintes índices 0 – ausente; 1 – discreto; 2 – moderado e 3 – intenso.

3.4.2. Padronização da técnica de Imunodifusão Radial

A padronização da técnica de Imunodifusão Radial foi realizada no Laboratório de Retrovírus (RetroLab) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.4.2.1. Purificação da imunoglobulina bovina

A purificação da imunoglobulina (Ig) bovina foi realizada segundo McKinney e Parkinson (1987) com modificações e é ilustrada na Figura 1. Foram coletados 30 mL de soro de três bovinos adultos saudáveis para constituir o *pool* de soro para este procedimento.

Foram produzidas duas soluções para uso na purificação. A primeira, solução de tampão acetato (0,06 mol/L), foi produzida misturando-se 41 mL de solução de Ácido Acético 0,2 mol/L com 9 mL de solução de Acetato de Sódio 0,2 mol/L, o volume foi completado para 100 mL com água destilada e o pH foi ajustado para 4,0 com NaOH 1 mol/L ou HCl 0,1 mol/L. A segunda solução utilizada foi a solução saturada de Sulfato de Amônio, produzida na proporção de 761 g de Sulfato de Amônio para 1 L de água destilada aquecida à 50°C em forno micro-ondas para facilitar a dissolução. O pH dessa solução foi ajustado para 7,2 com NaOH 1 mol/L ou HCl 0,1 mol/L.

O *pool* de soro bovino foi aquecido à 56°C por 20 minutos em banho-maria. Em seguida, foi centrifugado a 2240 g por 20 minutos. O sobrenadante foi colocado em um béquer e o sedimento foi descartado. Diluiu-se o sobrenadante na proporção de 1:5 com Tampão Acetato 0,06 mol/L em agitação constante em agitador magnético (pH 4,5). Adicionou-se Ácido Caprílico P.A. por gotejamento (25 µL para cada 1 mL de amostra diluída) e a solução foi mantida sob agitação constante por 30 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 8960 g por 1 hora e 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado para remoção das partículas não sedimentadas durante a centrifugação e o pellet foi descartado. Misturou-se o filtrado com PBS 10X na proporção de 1:10 (pH 7,4). Em ambiente refrigerado (4°C), acrescentou-se solução saturada de Sulfato de Amônio (1:1) por gotejamento. A solução obtida foi deixada sob agitação por 30 minutos e posteriormente foi centrifugada a 8960 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em PBS 1X (10% do volume inicial). O produto ressuscitado foi dialisado contra 5l de PBS 1X por 24

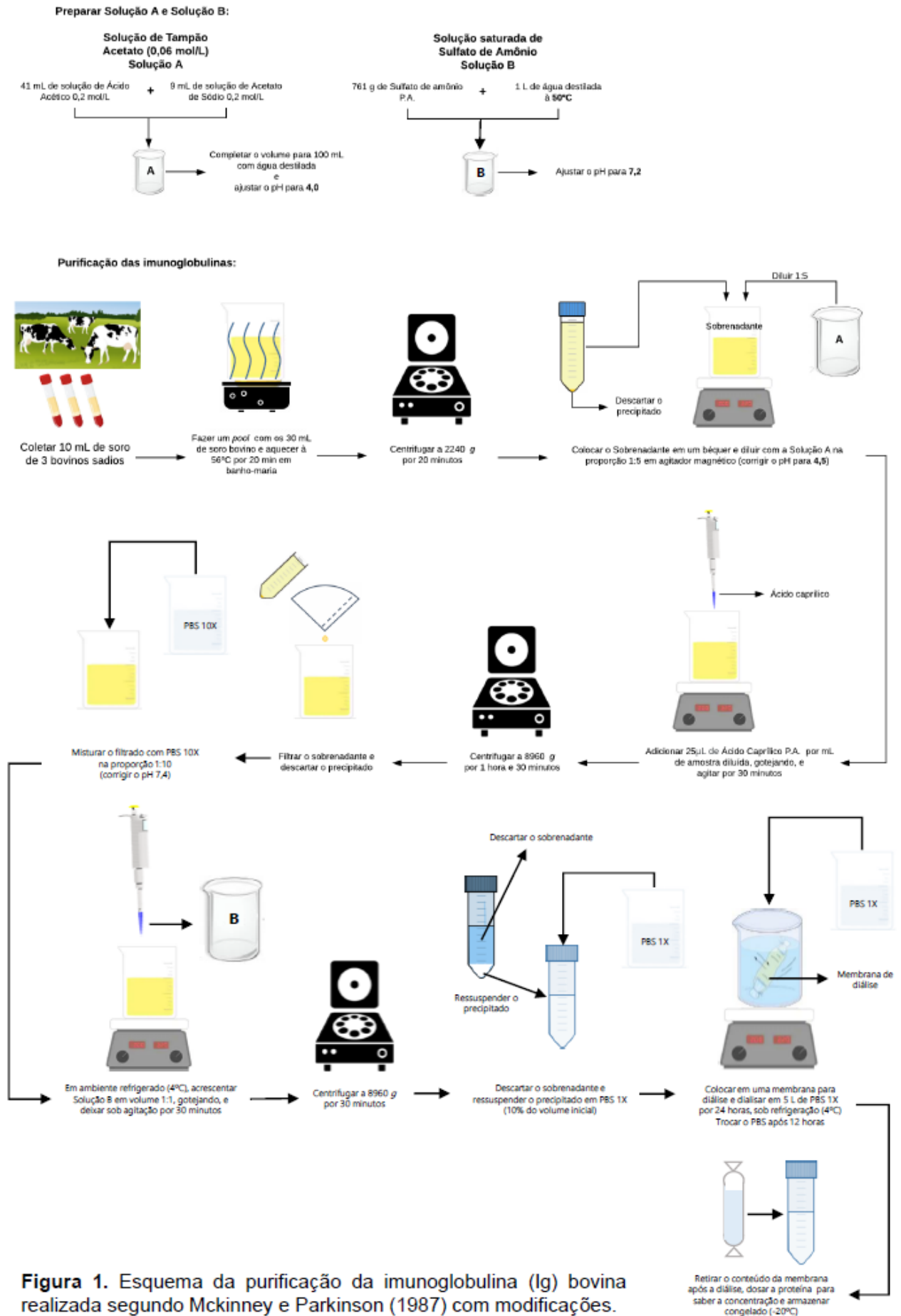


Figura 1. Esquema da purificação da imunoglobulina (Ig) bovina realizada segundo Mckinney e Parkinson (1987) com modificações.

horas sob refrigeração a 4°C e agitação, sendo que o PBS 1X foi trocado uma vez durante o procedimento. Para aferir a pureza da imunoglobulina purificada, a Proteína Total foi dosada no analisador bioquímico automático (COBAS Mira Plus®) e foi realizado um SDS-PAGE. O produto final foi armazenado a -20°C.

A Ig bovina purificada foi utilizada tanto na inoculação dos coelhos para produção da anti-IgBov quanto no controle dos ensaios de Imunodifusão Radial.

3.4.2.2. Obtenção da anti-imunoglobulina bovina em coelhos

Foram utilizadas três coelhas da raça Nova Zelândia de aproximadamente 4 meses para a produção de anti-imunoglobulina bovina (anti-IgBov). Ao chegarem, os animais foram pesados e vermifugados (Ivermectina 3,5% na dose de 0,2mg/kg, SC) e permaneceram em quarentena pelo período de uma semana.

Para a primeira inoculação preparou-se, para cada coelho, 2 mL de uma emulsão utilizando a Ig bovina purificada (0,5 mg/mL) e Adjuvante Completo de Freund (v/v) em tubo tipo *ependorf* na câmara de fluxo. A solução foi homogeneizada por 30 minutos em agitador de tubo e, ao final do processo, verificou-se a estabilidade da emulsão colocando uma gota da mesma em um recipiente com água. Considerou-se que a emulsão estava estável quando a gota permanecia íntegra, sem dissolução na água. Para as demais inoculações, utilizou-se o Adjuvante Incompleto de Freund e o restante do protocolo foi mantido (REIS *et al.*, 1992).

Antes de cada inoculação, coletou-se aproximadamente 1mL de soro dos coelhos na veia auricular (agulha 13x0,45 mm) para titulação de anticorpos específicos. O inóculo foi injetado por via subcutânea, em múltiplos sítios ao longo do dorso dos animais (0,5 mL de inóculo em cada sítio).

As inoculações ocorreram nos dias 0, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 70. Após a terceira inoculação, foi realizada a avaliação da soroconversão dos coelhos para a produção da anti-Ig-Bov bovina. Foram realizadas técnicas de Imunodifusão Dupla em Gel de Ágar (IDGA) para titulação dos soros dos coelhos, como em estudo realizado por Penhale *et al.* (1970).

No dia 74, após sedação dos coelhos, foi realizada a exsanguinação total dos mesmos por punção cardíaca. O sangue obtido da exsanguinação foi mantido em geladeira

(4°C) *overnight* para completa retração do coágulo. O sangue foi, então, centrifugado e o soro hiperimune foi coletado.

3.4.2.3. Purificação da anti-imunoglobulina bovina

Para a obtenção da anti-IgBov, frações de 20 mL do soro hiperimune dos coelhos foram purificadas pela mesma técnica utilizada para a purificação da Ig bovina.

As amostras obtidas ao final do processo foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com agente redutor (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970) para verificação da pureza das amostras de Ig bovina purificada, soro dos coelhos e anti-IgBov.

3.4.2.4. Produção da Imunodifusão Radial

A Figura 2 apresenta o fluxograma da produção da Imunodifusão Radial.

Preparou-se 6 mL do gel de ágar Noble a 1,25% em tampão borato (pH 8,6) em forno de micro-ondas. Quando a temperatura do gel, após resfriamento, chegou a 50°C (medido com termômetro laser Raytek Raynger ST6®), foi adicionado 3.250 µg/mL de anti-IgBov purificado de coelho (1,39 mL de purificado de anti-IgBov com concentração de 1,4 g/dL de Proteína Total) aquecido à 45°C por dez minutos. A mistura foi transferida para uma placa de Petri de vidro de 90 x 18 mm que se encontrava em superfície nivelada. Assim que o gel solidificou, a placa de Petri era transferida para uma câmara úmida e levada à geladeira (4°C) pelo período de uma hora para completa estabilização do ágar.

Utilizando o Modelo de poços para placa de IDR (Anexo 1) sob a placa com o gel e um perfurador, foram feitos 19 poços de 0,4 cm de diâmetro, igualmente espaçados na placa.

Para obtenção do controle e da curva-padrão, adicionou-se 5µL do IgG bovino purificado de concentração conhecida (14,1 µg/mL) puro no primeiro poço, diluído 1:2 no segundo poço, diluído 1:4 no terceiro poço e diluído 1:8 no quarto poço (tomando-se o cuidado de limpar a parte externa da ponteira).

As amostras de soro de bezerros foram diluídas 1:4 em PBS 1 X. Adicionou-se 5µL de cada amostra diluída nos demais poços (da mesma forma tomando-se o cuidado

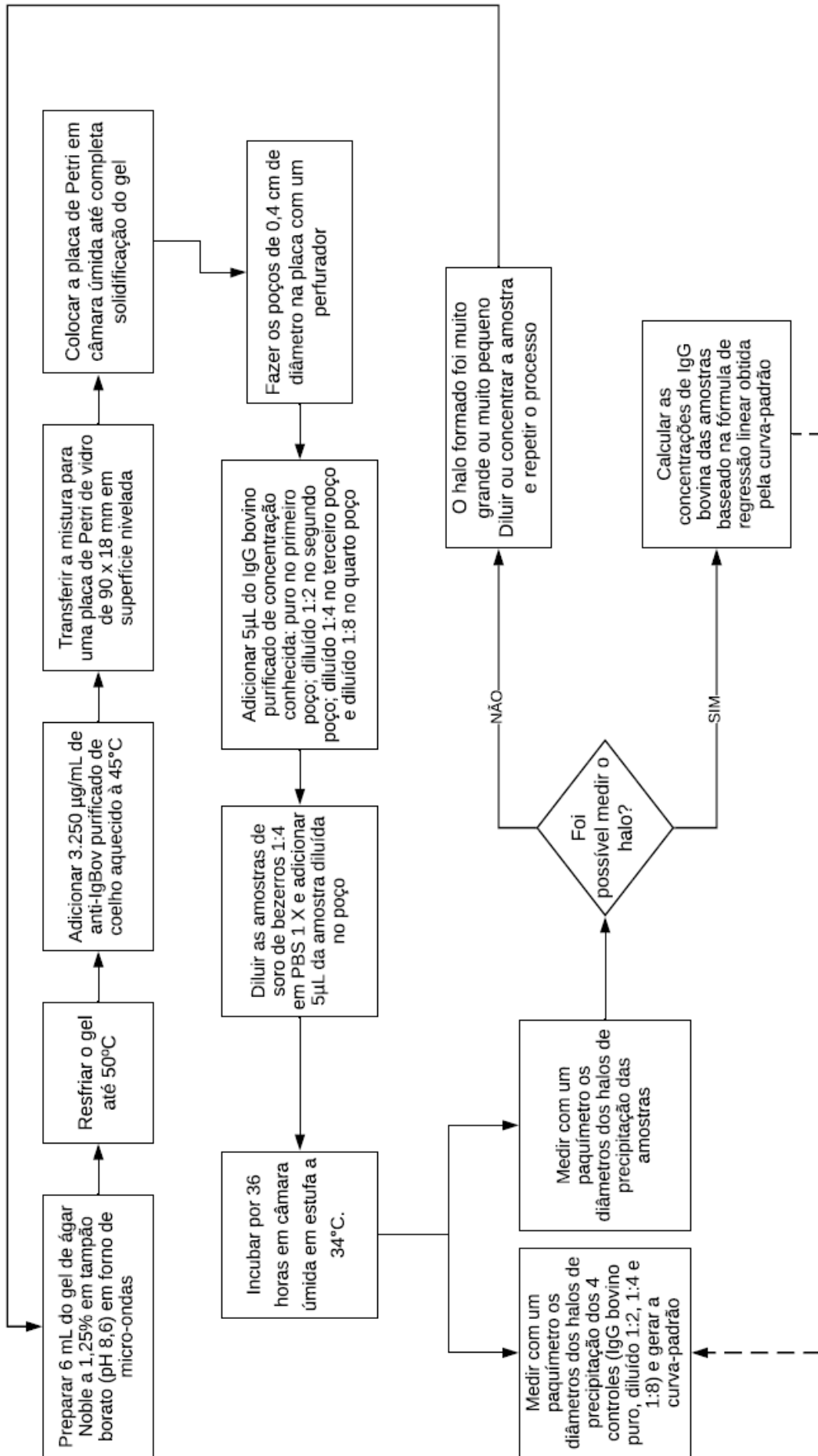


Figura 2. Fluxograma da produção da Imunodifusão Radial.

de limpar a parte externa da ponteira). As placas foram incubadas por 36 horas em câmara úmida em estufa a 34°C.

Os diâmetros dos halos de precipitação dos 4 controles (IgG bovino puro, diluído 1:2, 1:4 e 1:8), bem como das amostras, foram medidos utilizando um paquímetro (Digimess Stainless Hardned®). Caso a amostra não formasse halo, a mesma era repetida sem diluição. Caso o imunoprecipitado expandisse de modo a não formar halo, a amostra era repetida com diluição 1:6.

No Microsoft Office Excel®, a curva-padrão foi produzida correlacionando os resultados dos diâmetros dos controles às respectivas concentrações de IgG bovino (Anexo 2 – Protocolo IDR, Formulário e Planilha para conversão dos resultados da IDR). Baseado na fórmula de regressão linear obtida pela curva-padrão, foram calculadas as concentrações de IgG bovina das amostras de soro dos bezerros.

3.4.2.5. Avaliação da especificidade da IDR

Foram realizadas lâminas de Imunodifusão Dupla em Gel de Ágar (IDGA) segundo Coggins e Norcross (1970), com algumas modificações. O gel de ágar Noble a 1% foi preparado em microondas e distribuído (5,0 mL) em lâmina para microscopia. Após sua solidificação o ágar foi perfurado com um furador em pares. Depositou-se 25µL de amostras de soro de 5 bezerros diluídas 1:4 e nos poços opostos 25µL da anti-IgBov diluídas 1:4. As lâminas prontas foram armazenadas em câmaras úmidas e incubadas a temperatura ambiente por 48 horas. A leitura foi feita a olho nu ou com o auxílio de uma fonte de luz indireta sob um fundo escuro para a verificação da presença de linhas de precipitação entre o soro e o anti-IgBov.

3.4.3. Análise estatística

Foram calculados os principais índices de estatística descritiva. Além disso, como foram realizadas três mensurações para cada indivíduo, calculou-se o coeficiente de correlação intraclasses e a estimativa do coeficiente de variação intra-indivíduo e entre indivíduos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

3.5. Resultados e Discussão

3.5.1. A Imunodifusão Radial

A IDR foi padronizada segundo instruções de Feinberg (1998) com modificações. A técnica de IDR normalmente é realizada em gel de agarose, porém no presente estudo utilizou-se o gel de ágar Noble à 1,25%, devido ao seu elevado nível de pureza, em tampão Borato (pH 8,6), a fim de evitar o crescimento microbiológico (HOULSBY; GHAJAR; CHAVEZ, 1986).

Um ponto crítico para a adequada realização da técnica é manter os substratos nas temperaturas adequadas no momento da produção do gel, uma vez que as proteínas do purificado podem se desnaturar em temperaturas superiores à 50°C e o gel solidifica em temperaturas inferiores à 40°C (FEINBERG, 1998). Nesse sentido, todo o material utilizado para a produção da placa já deve estar previamente organizado e, se possível, as vidrarias utilizadas devem estar aquecidas e a transferência do gel para a placa de Petri deve ser rápida a fim de reduzir as perdas de temperatura durante o processo.

A média e desvio-padrão estimados das amostras foi de $2,747 \pm 1,854$ g/dL de imunoglobulinas, sendo o mínimo 0 g/dL e o máximo 9,225 g/dL. O primeiro quartil, a mediana e o terceiro quartil foram de 1,192 g/dL, 2,511 g/dL e 4,048 g/dL respectivamente. O coeficiente de variação entre indivíduos foi de 66%, indicando a heterogeneidade do banco de amostras. A heterogeneidade das amostras analisadas possibilitou a avaliação das características da técnica com amostras em distintas concentrações, tornando a avaliação da técnica mais robusta.

O coeficiente de correlação intraclassa foi de 95% e o coeficiente de variação intra-indivíduo foi de 15%, refletindo a variação de resultados da mesma amostra. Esses coeficientes indicam que a técnica apresentou boa reprodutibilidade dos resultados de cada indivíduo (THRUSFIELD; CHRISTLEY, 2018). Contudo, por ser uma técnica bastante manual, muitas falhas podem ocorrer no processo, por isso, o ideal é que a amostra de cada animal seja realizada em triplicata para confirmação do resultado. A fim de reduzir a necessidade de repetição das amostras, as amostras controle devem abranger a faixa prevista da concentração das amostras que serão testadas.

No presente estudo, embora as placas tenham sido incubadas em câmara úmida em estufa a 34°C, os halos só se formaram completamente após 36 horas. Em outros trabalhos a técnica levou de 18 a 24 horas para a obtenção dos resultados (AMERI; WILKERSON, 2008; CARDOSO; ELSOHABY; KEEFE, 2015; GELSINGER *et al.*, 2015; VON KEYSERLINGK; HÖTZEL, 2019). As placas podem ser incubadas em câmara úmida em temperatura ambiente, porém colocar as câmaras úmidas com as placas em estufa à 37°C acelera a formação dos halos de precipitação.

3.5.2. Pureza dos substratos utilizados para a produção da IDR

Foram realizados testes de SDS-PAGE e de IDGA para avaliar a pureza dos substratos utilizados no teste de IDR. No SDS-PAGE, foi possível observar a presença majoritária de bandas com massas moleculares equivalentes a 25KDa relacionadas à cadeias leves tanto da IgG bovina quanto da anti-IgG bovina produzida em coelhos e 50KDa relacionadas à cadeias pesadas também da IgG bovina e da anti-IgG bovina produzida em coelhos (BUTLER, 1983). Observou-se, no soro hiperimune de coelho não purificado, a presença da banda com massa molecular equivalentes a 65KDa relacionadas com a Albumina (Figura 1). Esse resultado indica que, embora o processo de purificação das amostras provoque uma redução significativa nas demais proteínas séricas, especialmente da albumina, ele não garante uma pureza de imunoglobulina nos substratos, de modo que não é correto afirmar que a IDR padronizada dosou especificamente a IgG.

Tanto na IDGA entre o purificado de imunoglobulina bovina e as amostras do anti-IgBov quanto na IDGA entre as amostras de soro de bezerros e as amostras do anti-IgBov, observou-se a formação de duas linhas de imunoprecipitado, sendo uma linha forte e uma linha fraca, confirmando a ocorrência de reações inespecíficas (Figura 2).

Diante dos resultados das técnicas de SDS-PAGE e IDGA, a técnica de IDR padronizada no presente trabalho não apresentou especificidade para dosar apenas IgG. Provavelmente foram identificadas outras frações das globulinas presentes nas amostras testadas (Figura 2).

Feitosa *et al.* (2001) apresentaram resultados semelhantes. Esses autores observaram que os resultados das concentrações de IgG estimados pela IDR que realizaram foram superiores aos resultados de γ -globulina determinadas pela

eletroforese tanto para animais com FTIP quanto para animais com adequada TIP (média e desvio-padrão da concentração de IgG na IDR e γ -globulina por eletroforese $2,60 \pm 1,34$ g/dL e $2,14 \pm 1,07$ g/dL, respectivamente), condição que não é coerente, indicando que a IDR possivelmente não dosou apenas IgG. Pfeiffer *et al.* (1977b) também relataram falhas na técnica de IDR, especialmente em amostras que apresentam elevados valores de IgG.

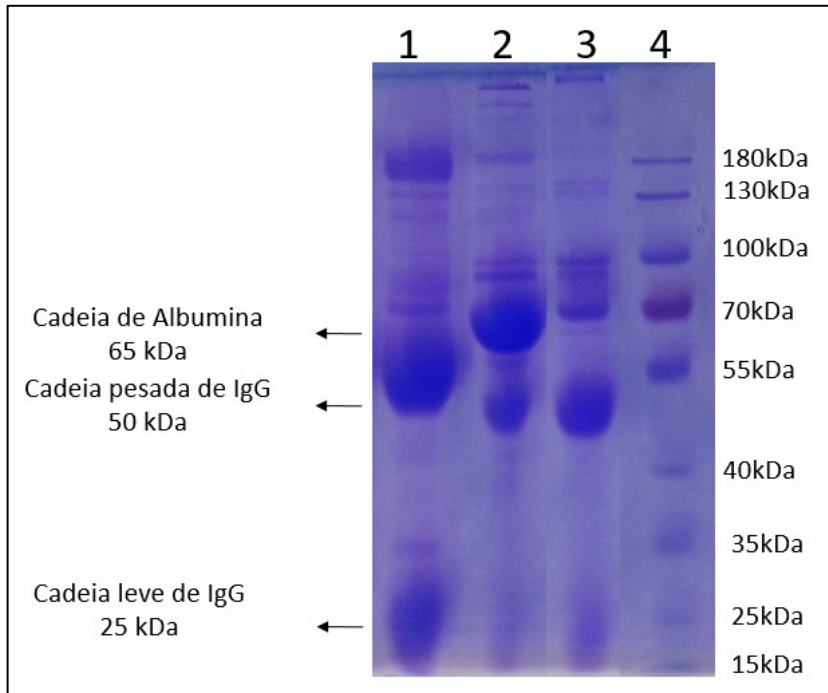


Figura 3. SDS-PAGE para determinação da pureza do IgG bovina e do purificado de anti-imunoglobulina G bovina produzido em coelhos. Canaleta 1: IgG Bovino purificado, Canaleta 2: Soro do coelho 1 puro, Canaleta 3: Purificado de anti-imunoglobulina G bovina produzido em coelho, Canaleta 4: Marcadores de peso molecular (15–180 kDa).

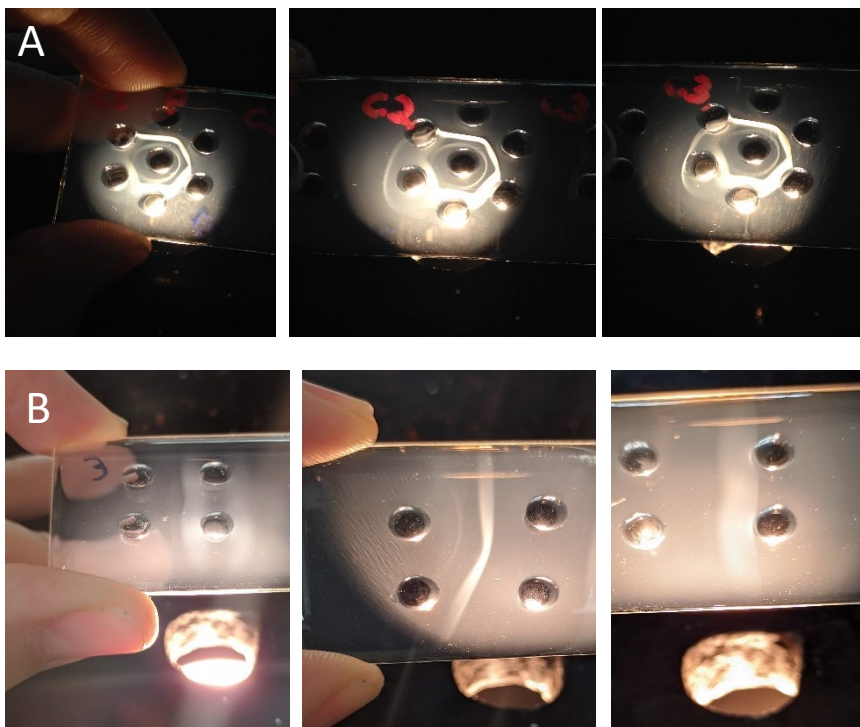


Figura 4. Imunodifusão Dupla em Gel de Ágar (IDGA) com titulação dos soros dos coelhos (A) e com amostras de soro de bezerros (B). Observa-se a formação de duas linhas de imunoprecipitado, sendo uma linha forte e uma linha fraca, confirmando a ocorrência de reações inespecíficas

Ameri e Wilkerson (2008), comparando dois kits comerciais de IDR disponíveis para a avaliação da TIP (kit VET-RID - Bethyl Laboratories, Montgomery, TX e kit SRID - VMRD Inc., Pullman, WA.), observaram divergência entre os resultados das concentrações de IgG. Os kits foram testados com purificados de IgGs bovina padronizadas com concentrações conhecidas (Bovine IgG SIGMA e Bovine IgG NVSL) e, embora o coeficiente de correlação entre as técnicas tenha sido bom ($r=0,84$), as análises de concordância entre as duas técnicas apresentaram média de -140,9 (-344,9 a 63,0; intervalo de confiança de 95%) com limites de concordância variando de -1042,5 (-1396,4 a -688,5; intervalo de confiança de 95%) a 760,6 (406,7–1114,6; intervalo de confiança de 95%). Demonstrou-se que um dos kits (VET-RID) se aproximou mais das concentrações esperadas dos padrões de IgG bovino purificados, enquanto o outro kit (SRID) superestimou consistentemente as concentrações dos padrões de IgG bovino purificados. Possivelmente a mesma falha ocorreu com a técnica de IDR do presente estudo. Nesse sentido, são necessários mais estudos para obter uma pureza mais elevada dos substratos utilizados na técnica e confirmar se as técnicas comerciais de IDR são capazes de dosar IgG de forma específica ou se, como na técnica aqui padronizada, dosam imunoglobulinas de um modo geral.

3.5.3. Interferentes da técnica

Quanto à influência da característica da amostra, as Figuras 2, 3 e 4 apresentam o efeito da característica de lipemia, hemólise e icterícia da amostra, respectivamente, no teste de Imunodifusão Radial. Estatisticamente o teste de IDR não sofreu interferência da lipemia, porém observa-se na Figura 2 uma tendência para essa diferença. Possivelmente, a diferença não foi evidenciada devido ao baixo número de amostras com lipemia moderada e intensa.

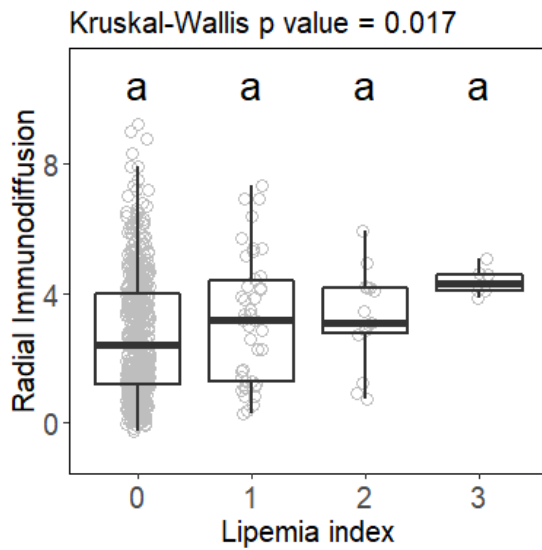


Figura 5. Efeito da característica de lipemia da amostra sobre a concentração de imunoglobulinas pelo teste de Imunodifusão Radial. Índice de lipemia: 0 – ausente; 1 – discreta; 2 – moderada e 3 – intensa.

O teste de IDR sofreu interferência da hemólise e icterícia. Amostras hemolisadas apresentaram médias das concentrações de imunoglobulinas inferiores às amostras não hemolisadas (Figura 3). Nesse sentido, amostras apresentando tal característica não devem ser utilizadas nessa técnica, a fim de evitar o comprometimento dos resultados.

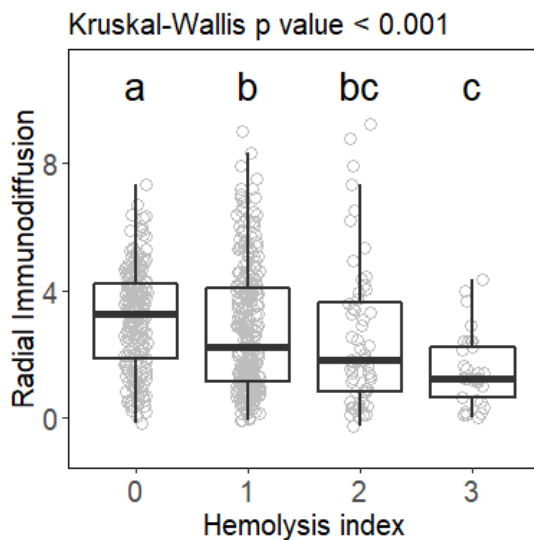


Figura 6. Efeito da característica de hemólise da amostra sobre a concentração de imunoglobulinas pelo teste de Imunodifusão Radial. Índice de hemólise: 0 – ausente; 1 – discreta; 2 – moderada e 3 – intensa.

A icterícia, ao contrário, apresentou uma tendência de aumento da concentração das imunoglobulinas (Figura 4). Do mesmo modo, a fim de evitar o comprometimento dos resultados da técnica, amostras apresentando icterícia não devem ser utilizadas na técnica de IDR.

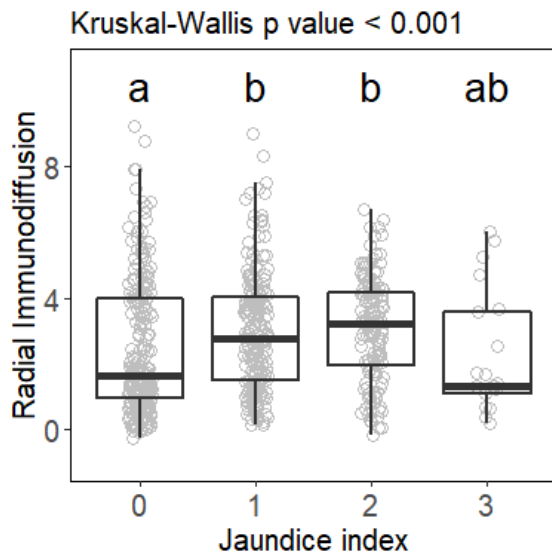


Figura 7. Efeito da característica de icterícia da amostra sobre a concentração de imunoglobulinas pelo teste de Imunodifusão Radial. Índice de icterícia: 0 – ausente; 1 – discreta; 2 – moderada e 3 – intensa.

3.5.4. *Uso da IDR como padrão-ouro para a avaliação da Transferência de Imunidade Passiva em Bezerros*

A técnica de Imunodifusão Radial (IDR) foi desenvolvida por Fahey e McKelvey no ano de 1965 e modificada no mesmo ano por Mancini, Carbonara e Heremans. Em 1969, Penhale e Chistie utilizaram a técnica da IDR para estimar imunoglobulinas no plasma e no colostro de bovinos adultos e observaram diferenças nas classes de imunoglobulinas entre as raças e subespécies. Em 1970, Penhale *et al.* utilizaram a técnica da IDR para quantificar imunoglobulinas no plasma de bezerros e correlacionaram com o histórico clínico de sobrevivência ou morte desses animais. Os autores observaram que bezerros deficientes em IgG ou IgM desenvolveram septicemia e morreram, indicando que as imunoglobulinas eram fatores essenciais para mediar a imunidade desses animais. A partir desse estudo, diversos outros foram realizados utilizando a mesma técnica com o objetivo de determinar a concentração das imunoglobulinas do colostro, bem como a concentração das imunoglobulinas séricas do bezerro a fim de avaliar a Transferência de Imunidade Passiva (TIP) (PFEIFFER *et al.*, 1977b; FLEENOR; STOTT, 1981; BURTON *et al.*, 1989; TYLER *et al.*, 1996).

Embora seja considerada por muitos pesquisadores do tema a técnica padrão-ouro para avaliar a TIP em bezerros (WEAVER *et al.*, 2000; GODDEN, 2008), a técnica de IDR fornece apenas uma estimativa semiquantitativa da concentração da imunoglobulina G, sendo questionada como técnica padrão-ouro por vários outros pesquisadores (DEELEN *et al.*, 2014; ELSOHABY; MCCLURE; KEEFE, 2015;

GELSINGER *et al.*, 2015; LORA *et al.*, 2019). A IDR necessita ser realizada em condições laboratoriais e depende de conhecimento técnico elevado. É uma técnica cara, que demanda criação de cobaias para produção dos reagentes, que são lábeis. Além disso, é uma técnica demorada, podendo levar de 18 a 24 horas para obtenção dos resultados e está sujeita a várias falhas e necessidade de repetição (GELSINGER *et al.*, 2015).

Os achados do presente trabalho levantaram questionamentos a respeito do uso da técnica de IDR como padrão-ouro para a avaliação da TIP, visto que para uma técnica ser considerada padrão-ouro não deveria estar associada a tantas falhas, especialmente havendo técnicas mais acuradas, simples e rápidas disponíveis. Nesse sentido, desenvolver e eleger técnicas mais modernas para o uso como padrão-ouro para a avaliação da TIP se faz necessário.

3.6. Conclusão

A técnica de Imunodifusão Radial não foi eficiente na determinação da concentração da imunoglobulina G de amostras de soro de bezerros para a avaliação da Transferência da Imunidade Passiva. São necessários mais estudos para obter uma pureza mais elevada dos substratos utilizados na técnica e confirmar se as técnicas comerciais de IDR são capazes de dosar IgG de forma específica. Amostras hemolisadas subestimaram e ictericas superestimaram resultados de IDR.

3.7. Agradecimentos

Os autores do trabalho agradecem ao RetroLab do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelo apoio e atenção na realização do trabalho. Os autores agradecem ainda à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de mestrado da estudante responsável pelo trabalho.

Referências

ABBAS, A. K. .; LICHTMAN, A. H. .; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 9 ed ed. [s.l.] Elsevier, 2018.

ALLEY, M. L.; HAINES, D. M.; SMITH, G. W. Short communication: Evaluation of serum immunoglobulin G concentrations using an automated turbidimetric immunoassay in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4596–4599, 2012.

- AMERI, M.; WILKERSON, M. J. Comparison of two commercial radial immunodiffusion assays for detection of bovine immunoglobulin G in newborn calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 3, p. 333–336, 2008.
- BURTON, J. L. *et al.* Variation in Serum Concentrations of Immunoglobulins G, A, and M in Canadian Holstein-Friesian Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 135–149, 1989.
- BUTLER, J. E. Bovine Immunoglobulins: A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 12, p. 1895–1909, 1969.
- BUTLER, J. E. Bovine immunoglobulins: An augmented review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 4, n. 1–2, p. 43–152, 1983.
- CARDOSO, C. S.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; HÖTZEL, M. J. Views of dairy farmers, agricultural advisors, and lay citizens on the ideal dairy farm. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, p. 1811–1821, 2019.
- COGGINS, L.; NORCROSS, N. L. Immuno-diffusion reaction in equine infectious anemia. **Cornell Vet.**, v. 60, p. 330–335, 1970.
- DEELEN, S. M. *et al.* Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3838–3844, 2014.
- DRIKIC, M. *et al.* Determining the IgG concentrations in bovine colostrum and calf sera with a novel enzymatic assay. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2018.
- ELSOHABY, I. *et al.* A rapid field test for the measurement of bovine serum immunoglobulin G using attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, 2015.
- ELSOHABY, I. *et al.* Quantification of bovine immunoglobulin G using transmission and attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 1, p. 30–37, 2016.
- ELSOHABY, I.; KEEFE, G. P. Preliminary validation of a calf-side test for diagnosis of failure of transfer of passive immunity in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4754–4761, 2015.
- ELSOHABY, I.; MCCLURE, J. T.; KEEFE, G. P. Evaluation of Digital and Optical Refractometers for Assessing Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 721–726, 2015.
- FAHEY, J. L.; MCKELVEY, E. M. Quantitative Determination of Serum Immunoglobulins in Antibody-Agar Plates. **The Journal of immunology**, v. 1, n. 94, p. 84–90, 1965.
- FEINBERG, G. Single Radial Immunodiffusion. In: **Encyclopedia of Immunology**. [s.l.: s.n.]. p. 1287–1289.
- FEITOSA, F. L. F. *et al.* Diagnóstico De Falha De Transferência De Imunidade Passiva Em Bezerros Através Da Determinação De Proteína Total E De Suas Frações Eletroforéticas, Imunoglobulinas G E M E Da Atividade Da Gama Glutamil Transferase No Soro Sangüíneo. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 251–255, 2001.
- FLEENOR, W. A.; STOTT, G. H. Single Radial Immunodiffusion Analysis for Quantitation of Colostral Immunoglobulin Concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 5, p. 740–747, 1981.
- GELSINGER, S. L. *et al.* 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. 4084–4089, 2015.
- GODDEN, S. Colostrum Management for Dairy Calves. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 19–39, 2008.
- HAY, F. C.; WESTWOOD, O. M. R. **Practical Immunology**. 4. ed. [s.l.] Blackwell Science, 2002. v. 4
- HOULSBY, R. D.; GHAJAR, M.; CHAVEZ, G. Antimicrobial Activity of Borate-Buffered Solutions. n. May, p. 803–806, 1986.

- KANECO, J. J.; HARVEY, J. W. .; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. [s.l.] Academic Press, 2008.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LORA, I. *et al.* Transfer of passive immunity in dairy calves: The effectiveness of providing a supplementary colostrum meal in addition to nursing from the dam. **Animal**, v. 13, n. 11, p. 2621–2629, 2019.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. IMMUNOCHEMICAL QUANTITATION OF ANTIGENS BY SINGLE RADIAL IMMUNODIFFUSION. **Immunochemistry**, v. 2, n. 461, p. 235–254, 1965.
- MCKINNEY, M. M.; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **Journal of Immunological Methods**, v. 96, n. 2, p. 271–278, 1987.
- PENHALE, W. J. *et al.* Quantitative studies on bovine immunoglobulins. II. Plasma immunoglobulin levels in market calves and their relationship to neonatal infection. **The British veterinary journal**, v. 126, n. 1, p. 30–32, 1970.
- PENHALE, W. J.; CHRISTIE, G. Quantitative studies on bovine immunoglobulins: I. Adult plasma and colostrum levels. **Research in Veterinary Science**, v. 10, p. 493, 1969.
- PFEIFFER, N. E. *et al.* Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 693–698, 1977.
- REIS, J. K. P. . *et al.* Produção e titulação de soro imune anti-espécie. **Anais do XIII Encontro de Pesquisa**, p. 26, 1992.
- THRUSFIELD, M.; CHRISTLEY, R. **Veterinary Epidemiology**. 4. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2018.
- TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology**. 9. ed. [s.l.] Elsevier, 2013.
- TYLER, J. W. *et al.* Evaluation of 3 Assays for Failure of Passive Transfer in Calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)**, v. 10, n. 5, p. 304–307, 1996.
- VAERMAN, J.-P. *et al.* FURTHER STUDIES ON SINGLE RADIAL - IMMUNODIFFUSION II THE REVERSED SYSTEM: DIFFUSION OF ANTIBODIES IN ANTIGEN-CONTAINING GELS. **Immunochemistry**, v. 6, p. 287–293, 1969.
- WEAVER, D. M. *et al.* Passive transfer of colostrum immunoglobulins in calves. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 6, p. 569–577, 2000.

4. CAPÍTULO 3 – ESTUDO DE PONTOS DE CORTE PARA AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS EM CONDIÇÕES DE CLIMA TROPICAL DE CRIAÇÃO

Rayanne Soalheiro de Souza¹, Matheus Ferreira Serafini², João Paulo Andrade², José Azael Zambrano Uribe³, Jenner Karlisson Pimenta dos Reis⁴, Fabiola de Oliveira Paes Leme⁵, Tiago Facury Moreira⁵, Elias Jorge Facury Filho⁵.

¹Mestranda do Programa Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais

²Doutorandos do Programa Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais

³Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais

⁴Professor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade Federal de Minas Gerais

⁵Professor(a) do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária pela Universidade Federal de Minas Gerais

4.1. Resumo

Classicamente, a Falha na Transferência da Imunidade Passiva é definida como uma concentração sérica de IgG menor que 1,0 g/dL em bezerros, entre 1 e 7 dias de idade e está relacionada com maior risco de mortalidade e morbidade, possível aumento no uso de antibióticos, redução no ganho de peso e da produção de leite futura. Contudo, esse ponto de corte vem sendo questionado, bem como a técnica de Imunodifusão Radial (IDR), utilizada como padrão-ouro para avaliar a Transferência de Imunidade Passiva (TIP) em bezerros. O objetivo do presente trabalho foi propor pontos de corte para a Falha na Transferência da Imunidade Passiva para rebanhos em condição de clima tropical com base em resultados de mortalidade e morbidade, utilizando as técnicas de refratometria óptica de Proteína Total, refratometria digital de Proteína Total, refratometria digital de Brix, Proteína Total e frações em analisador bioquímico automático e IDR padronizada *in house*. Além disso, outro objetivo foi sugerir outra técnica para ser utilizada como padrão-ouro em substituição à IDR. Em condições tropicais de criação de bezerros, os pontos de corte para Boa e Excelente TIP foram,

respectivamente, 7,0 g/dL e 9,0 g/dL para Proteína Total, 4,8 g/dL e 7,4 g/dL para Globulinas e 2,0 g/dL e 3,5 g/dL para IgG. A dosagem de Globulinas foi mais representativa da TIP, devendo ser utilizada como técnica padrão-ouro. Os refratômetros superestimaram as concentrações de Proteína Total, necessitando aumento no seu ponto de corte ou um fator de correção para seu uso.

Palavras-chave: morbidade, mortalidade, bezerro neonato, globulinas.

4.2. Abstract

Classically, Failure of Transfer of Passive Immunity is defined as a serum concentration of IgG less than 1.0 g/dL in calves between 1 and 7 days of age and is related to increased risk of mortality and morbidity, possible increase in use of antibiotics, reduction in weight gain and future milk production. However, this cut-off point has been questioned (especially for tropical rearing conditions), as well as the technique of Radial Immunodiffusion (RID) used as the gold standard for evaluating Transfer of Passive Immunity (TPI) in calves. The objective of the present study was to propose Failure of Transfer of Passive Immunity cutoff points for herds in tropical climate conditions based on mortality and morbidity results, using optical refractometry for Total Protein, digital refractometry for Total Protein, digital refractometry for Brix, Total Protein and fractions in automated biochemical analyzer and in-house standardized RID techniques. Furthermore, other objective was to suggest another technique to be used as a gold standard to replace the RID. Under tropical calf rearing conditions, the cutoff points for Good and Excellent TIP were, respectively, 7.0 g/dL and 9.0 g/dL for Total Protein, 4.8 g/dL and 7.4 g/dL for Globulins and 2.0 g/dL and 3.5 g/dL for Immunoglobulin G. The Globulin evaluation was more representative of TPI and should be used as the gold standard technique. Refractometers overestimated Total Protein concentrations, requiring an increase in their cutoff or a correction factor for their use.

Keywords: morbidity, mortality, neonate calf, globulins.

4.3. Introdução

A vaca possui uma placenta denominada sinepiteliocorial cotiledonar, composta por diversas camadas, sendo: Endotélio fetal; Mesênquima (tecido fetal); Epitélio coriônico

ou trofoblástico; Epitélio uterino; Estroma endometrial e Endotélio materno (PETER, 2013; SANTOS; SILVA; BELETTI, 2017). Tal quantidade de camadas dificulta a passagem de macromoléculas, como as imunoglobulinas, da circulação materna à circulação fetal, de modo que o bezerro é dependente da ingestão do colostro para adquirir as imunoglobulinas maternas que conferem imunidade passiva contra patógenos (CHASE; HURLEY; REBER, 2008; CORTESE, 2009). A Transferência de Imunidade Passiva (TIP) é definida pela absorção da imunoglobulina materna contida no colostro, primeiro leite ordenhado após o parto, pelo intestino delgado do bezerro, durante as primeiras 24 horas após o nascimento (BUSH; STALEY, 1980; GODDEN, 2008).

Classicamente, a Falha na Transferência da Imunidade Passiva (FTIP) é definida como uma concentração sérica de IgG menor que 1,0 g/dL em bezerros entre 1 e 7 dias de idade (TYLER *et al.*, 1996; WEAVER *et al.*, 2000; MCGUIRK; COLLINS, 2004; GODDEN, 2008), indicando que o bezerro não foi capaz de absorver quantidade satisfatória de imunoglobulinas maternas do colostro.

A FTIP está relacionada com maior risco de mortalidade e morbidade e possível aumento no uso e risco de resistência aos antibióticos (DONOVAN *et al.*, 1998; BERGE *et al.*, 2005; FURMAN-FRATCZAK; RZASA; STEFANIAK, 2011; CHIGERWE; HAGEY; ALY, 2015; WINDEYER *et al.*, 2014; LORA *et al.*, 2018). Além disso, está associado à redução no ganho de peso e aumento das chances de encaminhamento para o abate devido à baixa produção de leite causando prejuízos ao sistema produtivo (DENISE *et al.*, 1989; WINDEYER *et al.*, 2014).

Os custos totais médios (intervalo de confiança de 95%) estimados por bezerro leiteiro com FTIP foi de € 60 (€ 10-109), variando entre € 52 (melhor cenário) e € 285 (pior cenário), com um aumento de aproximadamente 50% para bezerros de corte (RABOISSON; TRILLAT; CAHUZAC, 2016). Assim, a FTIP implica em um importante impacto econômico nos sistemas de criação de bezerros.

Estima-se que a prevalência de FTIP nos Estados Unidos tenha reduzido de 40% nos anos de 1991-1992 para 19,7% em 2007 (BEAM *et al.*, 2009) e para 12,1% em 2014 (SHIVLEY *et al.*, 2018), provavelmente devido às melhorias nos manejos dos sistemas de criação de bezerros no sentido de monitorar a TIP e corrigir as falhas. Segundo

Beam *et al.* (2009) a FTIP é mais prevalente em fazendas que não monitoram rotineiramente a TIP, apresentando 13,8 vezes mais chances de ter bezerros apresentando FTIP.

Sendo assim, para garantir que os bezerros foram adequadamente imunizados e que a colostragem está sendo eficaz, é necessário dosar direta ou indiretamente a imunoglobulina no soro dos animais. A principal técnica para a dosagem direta de imunoglobulinas, segundo a literatura, é a Imunodifusão Radial (IDR), considerada padrão-ouro para avaliar a TIP em bezerros (WEAVER *et al.*, 2000; GODDEN, 2008). Todavia, deve ser realizado em laboratório, é uma técnica cara, necessita de reagentes lábeis produzidos em cobaias, requer mão de obra tecnicada e um mínimo de 18 a 24 horas para obtenção dos resultados. Além de estar sujeita a várias falhas e necessidade de repetição, sua utilização vem sendo questionada como padrão-ouro (DEELEN *et al.*, 2014; ELSOHABY; MCCLURE; KEEFE, 2015; GELSINGER *et al.*, 2015; LORA *et al.*, 2019).

Além da IDR, diversas outras técnicas avaliam diretamente a imunoglobulina, como os Imunoensaios Turbidimétricos (ALLEY; HAINES; SMITH, 2012; ELSOHABY; KEEFE, 2015), o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)(GELSINGER *et al.*, 2015), a técnica de eletroforese (PFEIFFER *et al.*, 1977), o método espectroscópico de infravermelho por Transmissão e por Refletância Total Atenuada (ATR)(ELSOHABY *et al.*, 2015, 2016) e o Teste da Imunoglobulina G por Trealase Dividida (STIGA)(DRIKIC *et al.*, 2018), e poderiam ser utilizadas em substituição à técnica padrão-ouro, inclusive a campo (testes point-of-care (POC)).

Já para a dosagem indireta de imunoglobulinas, têm-se as técnicas de análise bioquímica das proteínas totais e frações (HOGAN *et al.*, 2015), a proteína por refratometria (TYLER *et al.*, 1996; QUIGLEY, 2001a; MORRILL *et al.*, 2013; DEELEN *et al.*, 2014; ELSOHABY; MCCLURE; KEEFE, 2015; ELSOHABY *et al.*, 2019b); por refratômetro de BRIX (MORRILL *et al.*, 2012, 2013; DEELEN *et al.*, 2014; ELSOHABY; MCCLURE; KEEFE, 2015; QUIGLEY, 2016; ELSOHABY *et al.*, 2019b), o teste de turvação do sulfato de zinco (PFEIFFER *et al.*, 1977a; MORAES *et al.*, 2000; HOGAN *et al.*, 2015) e o teste de turvação do sulfato de sódio (PFEIFFER; MCGUIRE, 1977; TYLER *et al.*, 1996). Várias dessas técnicas são práticas, rápidas, baratas e podem ser utilizadas a campo para inferir a TIP.

O ponto de corte para FTIP foi definido como 1,0 g/dL de IgG em 1996, num cenário de fornecimento de baixo volume de colostro (TYLER *et al.*, 1996) e, desde então, é sugerido por diversos autores (WEAVER *et al.*, 2000; MCGUIRK; COLLINS, 2004; GODDEN, 2008). No entanto, esse ponto de corte vem sendo questionado e alguns autores sugerem pontos de corte mais elevados, como 1,5 g/dL (DAVIS; DRACKLEY, 1998) ou, de 2,0 g/dL à 2,5 g/dL (CHIGERWE; HAGEY; ALY, 2015), que são mais coerentes com os desafios impostos pelos sistemas de criação atuais. Ainda não há um consenso entre os pesquisadores do tema, sendo que muitos persistem utilizando o ponto de corte de 1 g/dL de IgG para determinar a FTIP. Observa-se, ainda, que há uma escassez de estudos sobre a TIP em condições de criação em climas tropicais, que naturalmente já impõem maiores desafios aos animais e normalmente envolve animais mestiços, que de modo geral, tem concentração de IgG mais elevadas no colostro, e não se sabe, até o momento, se o ponto de corte para a FTIP seria o mesmo utilizado para as condições de clima temperado.

O objetivo desse trabalho foi comparar técnicas de mensuração da TIP e propor pontos de corte para a FTIP para rebanhos em condição de clima tropical com base em resultados de mortalidade e morbidade, utilizando as técnicas de refratometria óptica de Proteína Total, refratometria digital de Proteína Total, refratometria digital de Brix, Proteína Total e frações em analisador bioquímico automático e IDR padronizada *in house*. Além disso, sugeriu-se outra técnica para ser utilizada como padrão-ouro em substituição à IDR.

4.4. Material e métodos

Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pelo CEUA-UFMG (protocolo n° 308/2019).

4.4.1. Amostras

Foram utilizadas 418 amostras de soro de bezerros de 24 a 48 horas de idade da soroteca do Laboratório da Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV) da Escola de Veterinária da UFMG provenientes de diversas fazendas.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. As amostras advinham de fazendas comerciais que solicitavam a dosagem de Proteína Total por refratometria para avaliação indireta da Transferência da Imunidade Passiva dos bezerros e realizavam este monitoramento de forma rotineira. Desse modo, não foram realizadas manipulações nos bezerros, além das práticas rotineiras das fazendas.

As amostras estavam armazenadas no laboratório congeladas (-20°C) e eram descongeladas a 37,5°C por 10 minutos em termobloco para a realização das análises bioquímicas.

4.4.2. Critérios de inclusão

Para padronização das técnicas, foram utilizadas amostras límpidas e alteradas (hemolisadas, lipêmicas e ictéricas) de soro de bezerros independente de sexo, raça e peso, com faixa etária conhecida entre 24 a 48 horas de vida.

4.4.3. Procedimentos

Foram realizadas, com a mesma amostra, em triplicata, as análises de: (1) Proteína Total e Albumina Sérica no COBAS Mira Plus® (analisador bioquímico automático) e posterior cálculo das globulinas (por diferença); (2) refratometria óptica de Proteína Total com refratômetro portátil Mega Brix®, Modelo RHC-200AT (SC Metra S.R.L., Piata Cazarmii, Romênia); (3) análises de refratometria BRUX e Proteína Total digital (Misco Palm Abbe digital refractometer PA203®); e (4) Imunodifusão Radial padronizada *in house*. Todas as análises foram realizadas por um único avaliador. Por questões de volume de amostra e/ou custo da técnica, nem todas as técnicas de análises foram realizadas com todas as amostras, sendo o número das análises especificados nas respectivas tabelas

Com exceção da Padronização da Imunodifusão Radial, que foi realizada no Laboratório de Retrovíruses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, todas as análises foram realizadas no MULTILAB do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG.

4.4.4. Análises da Proteína Total e Albumina Sérica no analisador bioquímico automático

A Proteína Total e a Albumina Sérica foram dosadas, em triplicata, utilizando 600 µL da amostra, com leitura em analisador bioquímico Cobas Mira Plus ® (Roche Analytical Instruments) pelo método do Biureto (kit Biotécnica Proteína Total VET ®) e método do Verde de Bromocresol (kit Biotécnica Albumina Sérica VET ®), respectivamente. As análises foram realizadas seguindo as instruções das bulas, após calibração do equipamento. A partir dos resultados obtidos para Proteína Total e Albumina Sérica no analisador bioquímico automático, foram estimados os resultados das Globulinas de cada amostra, segundo a fórmula (1):

$$\text{Concentração das Globulinas (g/dl)} = \text{Concentração da Proteína Total (g/dl)} - \text{Concentração da Albumina Sérica (g/dl)}$$

Para essas análises, foram obtidos 1254 valores válidos (418 amostras em triplicata – Tabela 1).

4.4.5. Refratometria óptica de Proteína Total

Utilizou-se 300 µL da amostra para as análises no refratômetro óptico para Proteína Total Mega Brix ®, Modelo RHC-200AT (SC Metra S.R.L., Piata Cazarmii, Romênia). No início de cada dia de análise, o equipamento era calibrado com água destilada. Para análise, eram depositados no prisma do refratômetro 100 µL de cada amostra de soro. O valor de Proteína Total do soro (g/dL) foi lido na linha de transição entre as áreas claras e escuras que aparecem na escala do refratômetro óptico. Para essa análise, foram obtidos 1254 valores válidos (418 amostras em triplicata – Tabela 1).

4.4.6. Refratometria digital BRIX e Proteína Total

Utilizou-se 150 µL da amostra o refratômetro digital para BRIX e Proteína Total Misco Palm Abbe digital refractometer PA203 ®. No início de cada dia de análise, o equipamento era calibrado com água destilada. Para análise, eram depositados no prisma do refratômetro 50 µL de cada amostra de soro. Os valores de porcentagem BRIX e Proteína Total do soro (g/dL) foram obtidos pela leitura digital. Para essa análise, foram obtidos 1191 valores válidos (397 amostras em triplicata – Tabela 1).

4.4.7. Imunodifusão Radial padronizada *in house*

A descrição completa da padronização da IDR pode ser lida no Capítulo 2. Separou-se 200 µL da amostra para a realização da IDR. Em resumo, preparou-se 6 mL do gel de ágar Noble a 1,25% em tampão borato (pH 8,6) ao qual foi adicionado 3.250 µg/mL de anti-IgG bovino purificado de coelho. A mistura foi transferida para uma placa de Petri de vidro de 90 x 18 mm que se encontrava em plataforma nivelada. Após completa polimerização do gel, o mesmo era perfurado. Para obtenção do controle e da curva-padrão, adicionou-se 5µL do IgG bovino purificado de concentração conhecida (14,1 µg/mL) puro no primeiro poço, diluído 1:2 no segundo poço, diluído 1:4 no terceiro poço e diluído 1:8 no quarto poço (limpando o exterior da ponteira). As amostras de soro de bezerros foram diluídas 1:4 com PBS 1 X. Adicionou-se 5µL de cada amostra diluída nos demais poços (limpando o exterior da ponteira). As placas foram incubadas por 36 horas em câmara úmida na estufa a 34°C. Os diâmetros dos halos de precipitação dos 4 controles (IgG bovino puro, diluído 1:2, 1:4 e 1:8), bem como das amostras, foram medidos utilizando um paquímetro (Digimess Stainless Hardned®). Caso a amostra não formasse halo, a mesma era repetida sem diluição. Caso o imunoprecipitado expandisse de modo a não formar halo, a amostra era repetida com diluição 1:6. No Microsoft Office Excel®, a curva-padrão foi produzida correlacionando os resultados dos diâmetros dos controles às respectivas concentrações de IgG bovino (Anexo 2 – Protocolo IDR, Formulário e Planilha para conversão dos resultados da IDR). Baseado na fórmula de regressão linear obtida pela curva-padrão, foram calculadas as concentrações de IgG bovina das amostras de soro dos bezerros. Para essa análise, foram obtidos 573 valores válidos (191 amostras em triplicata – Tabela 1).

4.4.8. Dados de mortalidade e morbidade

Os veterinários das fazendas cujas amostras foram incluídas nos estudos forneceram os dados de mortalidade e número de tratamentos (*i.e.*, morbidade) até os 90 dias de idade dos bezerros amostrados. Foram obtidos dados relativos à 75% (314/418) dos bezerros que tiveram amostras de soro analisadas. Segundo os veterinários das fazendas, considerou-se (1) diarreia como qualquer caso de bezerro apresentando fezes de consistência pastosa à líquida, sanguinolenta ou não; (2) pneumonia como qualquer caso de bezerro apresentando secreção patológica das narinas associado à tosse frequente, apatia e dispneia; (3) tristeza parasitária bovina como qualquer caso de bezerro apresentando mucosas hipocoradas e/ou ictéricas associado à redução no

consumo, apatia e hipertermia, sendo que alguns casos eram confirmados em esfregaço sanguíneo pela observação dos agentes etiológicos da doença (*Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e/ou *Babesia bigemina*). Os dados utilizados com consentimento livre e esclarecido dos proprietários dos animais.

4.4.9. Análises estatísticas

O teste de Shapiro-Wilk foi realizado com as variáveis quantitativas para análise de normalidade. Nenhuma variável quantitativa analisada apresentou distribuição normal, sendo assim, realizou-se análise estatística não paramétrica. A estatística descritiva foi calculada para os resultados de Proteína Total, Albumina Sérica e Globulinas no analisador bioquímico automático (g/dL), Proteína Total com o refratômetro óptico (g/dL), Proteína Total com refratômetro digital (g/dL), BRIX com refratômetro digital (%) e Imunodifusão Radial (g/dL). Calculou-se o coeficiente de correlação intraclasse, o coeficiente de variação intra-indivíduo e entre indivíduos. Produziu-se os gráficos de frequência de distribuição (histogramas) e, além disso, os resultados das variáveis quantitativas foram plotados uns contra os outros (regressão linear) e, a partir desses *plots*, foram determinados os coeficientes de correlação (r). A correlação entre o Refratômetro digital de PT e o de BRIX foi de 99,4%, uma vez que as análises foram feitas com o mesmo equipamento, com a mesma amostra e no mesmo momento. Sendo assim, os resultados das análises estatísticas foram idênticas e optou-se por apresentar apenas os resultados do refratômetro digital Brix e para os pontos de corte, considerou-se as duas técnicas de forma independente.

Foram ajustados modelos de regressão logística para os dados de mortalidade avaliados durante todo o período para as variáveis analisadas e construiu-se curvas ROC (em inglês *Receiver Operating Characteristic*). Os coeficientes foram extraídos, os pontos de corte das variáveis que correspondem a 5% e 10% de mortalidade predita pelos modelos de regressão ajustados foram calculados bem como as respectivas Odds Ratio (OR). Para os dados de número de doenças (i.e., morbidade), foram ajustados modelos lineares generalizados com a distribuição de Poisson. Para a morbidade, quatro variáveis resposta foram modeladas: o número total de tratamento aplicados em todo o período e o número de tratamentos aplicados apenas no primeiro, no segundo e no terceiro mês de vida do bezerro. Para todas as regressões citadas anteriormente, as variáveis preditoras avaliadas foram: Proteína Total e Globulina em

Analisador Bioquímico Automático, refratômetro digital de BRIX e refratômetro óptico de Proteína Total. Também foram calculadas as OR para a morbidade e verificou-se a frequência do número de tratamentos em cada um dos três meses de idade dos bezerros, aplicando-se o teste qui-quadrado para independência das prevalências das doenças entre os três meses.

Para a estimativa dos valores de referência, três medidas foram calculadas: a tendência central e os limites inferior e superior. Três métodos foram utilizados, um não paramétrico e dois paramétricos. Para o método não paramétrico, utilizou-se a mediana como medida de tendência central e os percentis 2,5% e 97,5% para estimar, respectivamente, os limites inferior e superior de um intervalo de 95% de confiança. Em relação aos métodos paramétricos, um foi na variável original, sem transformação e o outro foi aplicado após aplicação da transformação logarítmica. Calculavam-se a média e o desvio padrão e multiplicava-se o desvio padrão por 1,96 (quantil de 97,5% da distribuição normal padrão) encontrando a margem de confiança. Os limites inferior e superior do intervalo de 95% de confiança foram calculados subtraindo-se e somando-se, respectivamente, a margem de confiança à média. Ao final do cálculo com a variável transformada, aplicava-se a transformação logarítmica inversa (e^x) para retornar os valores à unidade original. Para os valores que apresentaram coeficiente de variação (CV) menor ou igual a 10%, utilizou-se a média dos métodos e para os valores que apresentaram coeficiente de variação (CV) maior que 10%, utilizou-se os valores do método não paramétrico, isso porque nenhuma variável apresentou distribuição normal, mesmo após transformação.

Modelos de regressão linear foram calculados e ajustados e as estimativas pontuais, assim como os respectivos intervalos de 95% de confiança para os parâmetros foram extraídos, a fim de testar a necessidade de correção entre os valores do refratômetro óptico e o refratômetro digital de Proteína Total e os valores de Proteína Total mensurados pelo analisador bioquímico automático.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R CORE TEAM, 2019).

4.5. Resultados

A Tabela 1 apresenta as médias, desvios-padrão, valores mínimo e máximo, coeficientes de variação, valores válidos, correlações intraclasse, coeficientes de variação intra-indivíduo e coeficientes de variação entre indivíduos para Imunodifusão Radial (IDR) padronizada, refratômetro óptico de Proteína Total (PT), refratômetro digital de Proteína Total, refratômetro digital Brix, Proteína Total (PT), Albumina e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA).

Tabela 1. Média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo, coeficiente de variação, valores válidos, correlação intraclasse, coeficiente de variação intra-indivíduo e coeficiente de variação entre indivíduos para Imunodifusão Radial (IDR) padronizada, refratômetro óptico de Proteína Total (PT), refratômetro digital de Proteína Total, refratômetro digital Brix, Proteína Total (PT), Albumina e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA).

	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Coeficiente de variação	Valores válidos	Correlação intraclasse	Coef. De variação intra-indivíduo	Coef. De variação entre indivíduos
IDR	2,747 g/dl	1,854 g/dl	0,01 g/dl	9,225 g/dl	0,67	573	0,95	0,15	0,66
Refratômetro óptico de PT	6,64 g/dl	1,31 g/dl	3,6 g/dl	10,8 g/dl	0,20	1250	1,00	0,01	0,2
Refratômetro digital de PT	6,92 g/dl	1,56 g/dl	3,8 g/dl	13,2 g/dl	0,23	1192	0,99	0,02	0,23
Refratômetro digital Brix	10,24 g/dl	1,8 g/dl	6,6 g/dl	17,3 g/dl	0,18	1192	0,99	0,01	0,18
PT em ABA	6,394 g/dl	1,438 g/dl	2,96 g/dl	11,5 g/dl	0,22	1254	0,98	0,03	0,22
Albumina em ABA	2,838 g/dl	0,312 g/dl	1,78 g/dl	4,95 g/dl	0,11	1254	0,94	0,03	0,11
Globulinas em ABA	3,557 g/dl	1,435 g/dl	0,36 g/dl	7,72 g/dl	0,40	1254	0,98	0,06	0,40

As Figuras 1 e 2 apresentam os número de animais por categoria do analito de distribuição da (1.A) imunoglobulina por IDR padronizada in house (n=573), (1.B) Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (n=1254), (1.C) Proteína Total em Analisador Bioquímico Automático (n=1254), (2.A) refratômetro óptico de Proteína Total (n=1250), (2.B) refratômetro digital de Proteína Total (n=1192) e (2.C) refratômetro digital Brix (n=1192).

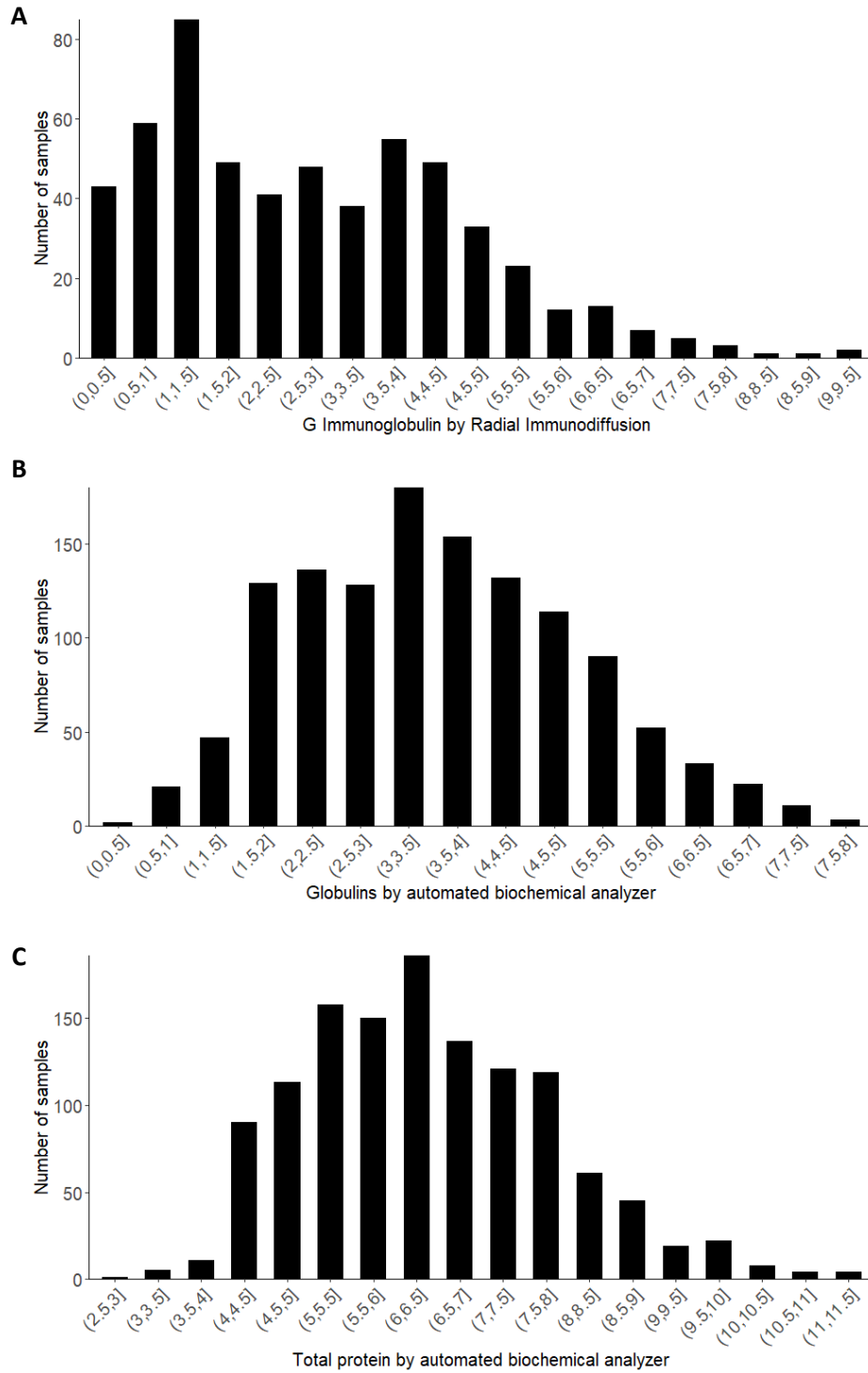


Figura 1. Número de animais por categoria em (A) imunoglobulina por IDR padronizada *in house* (n=573), (B) Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (n=1254) e (C) Proteína Total em Analisador Bioquímico Automático (n=1254).

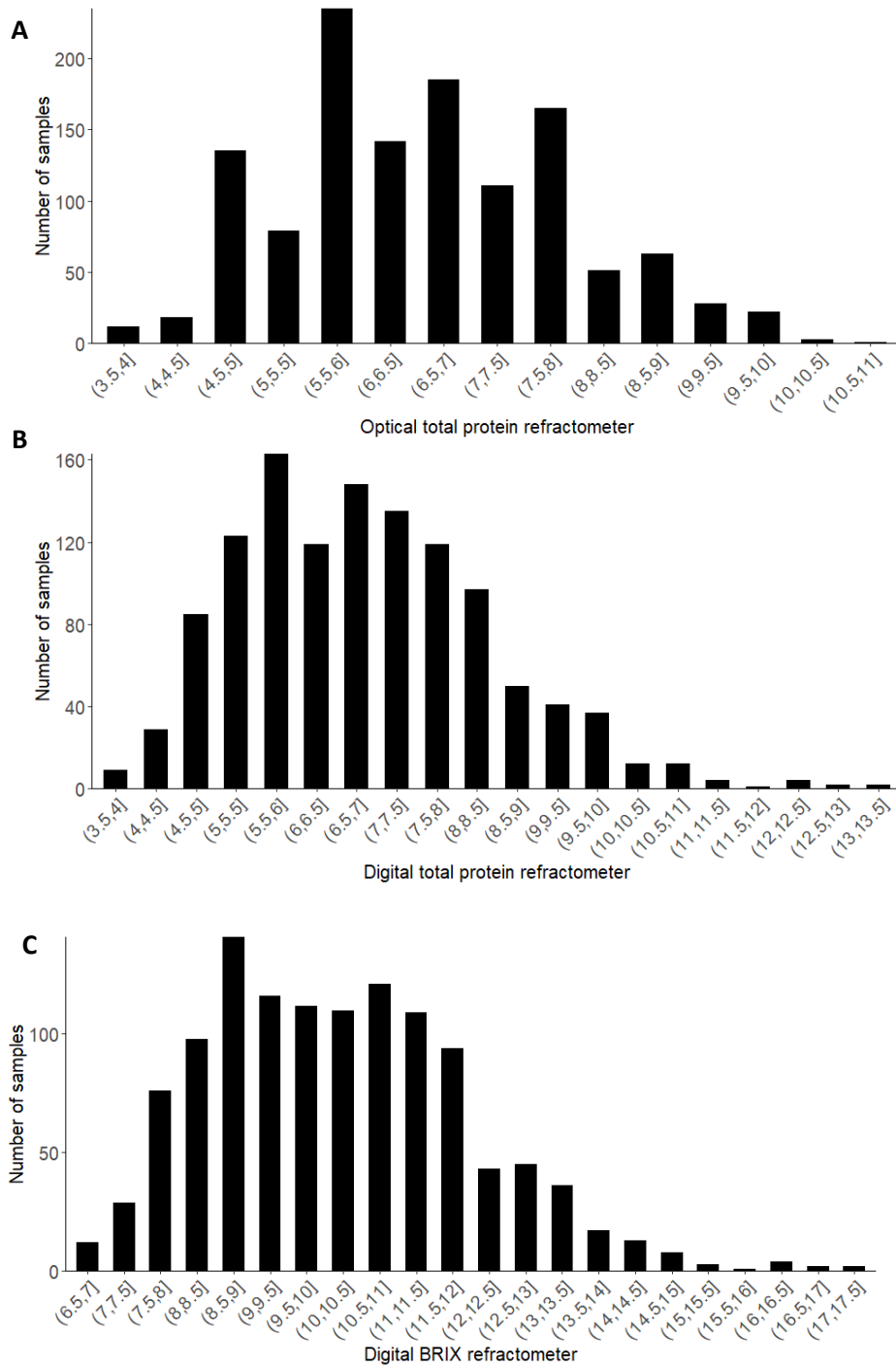


Figura 2. Número de animais por categoria em (A) refratômetro óptico de Proteína Total (n=1250), (B) refratômetro digital de Proteína Total (n=1192) e (C) refratômetro digital Brix (n=1192).

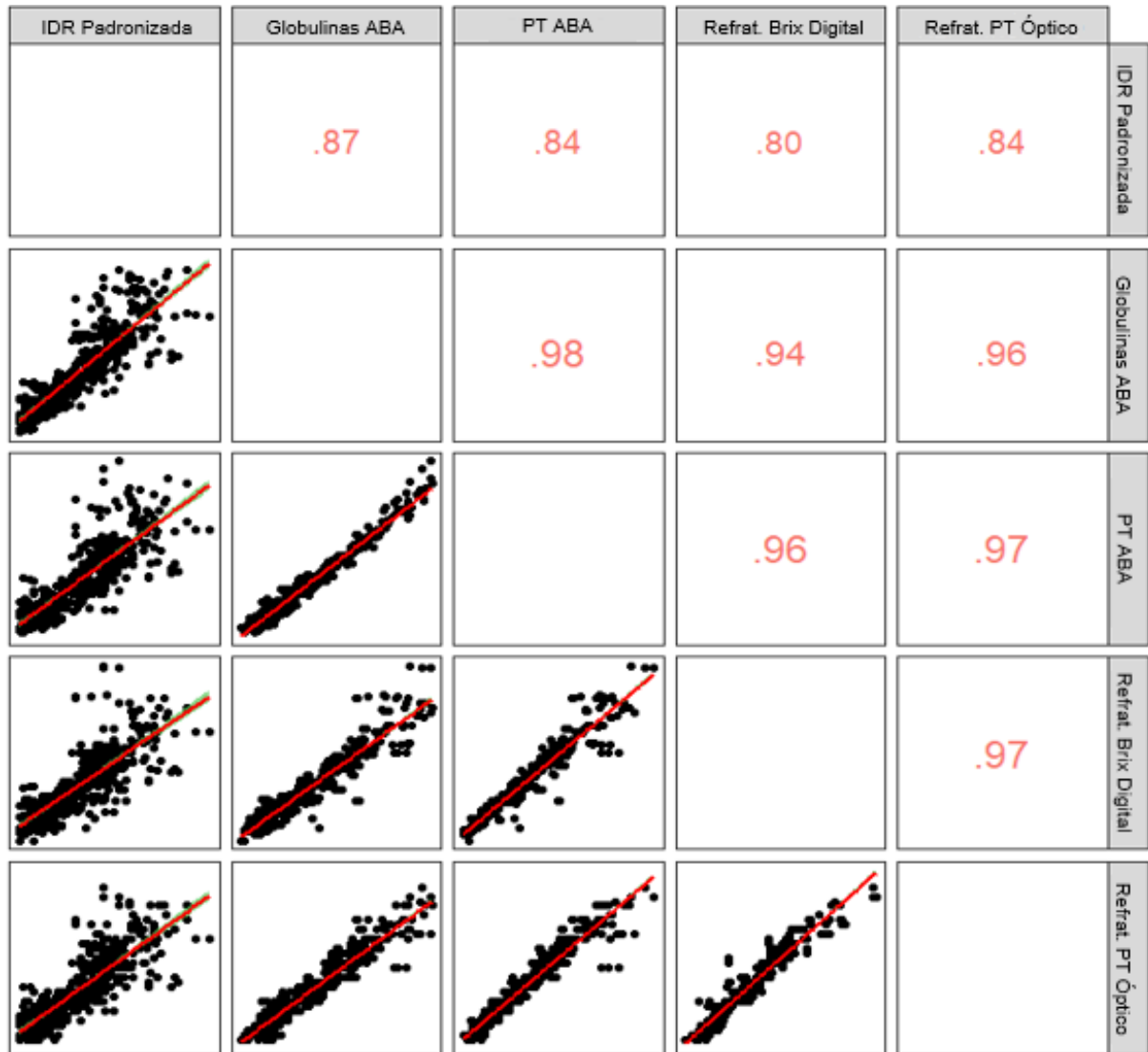


Figura 3. Regressões e coeficientes de correlação entre Imunodifusão Radial (IDR) padronizada, Globulinas e Proteína Total (PT) em Analisador Bioquímico Automático (ABA), refratômetro digital Brix, refratômetro óptico de Proteína Total e coeficientes de correlação.

A Figura 3 apresenta as regressões e coeficientes de correlação entre Imunodifusão Radial (IDR) padronizada, Globulinas e Proteína Total (PT) em Analisador Bioquímico Automático (ABA), refratômetro digital Brix, refratômetro óptico de Proteína Total e coeficientes de correlação. Todas as variáveis foram positivamente correlacionadas entre si, sendo que o menor coeficiente de correlação foi para IDR com o refratômetro digital Brix ($r=0,80$) e o maior coeficiente de correlação para IDR foi com Globulinas em Analisador Bioquímico Automático ($r=0,87$).

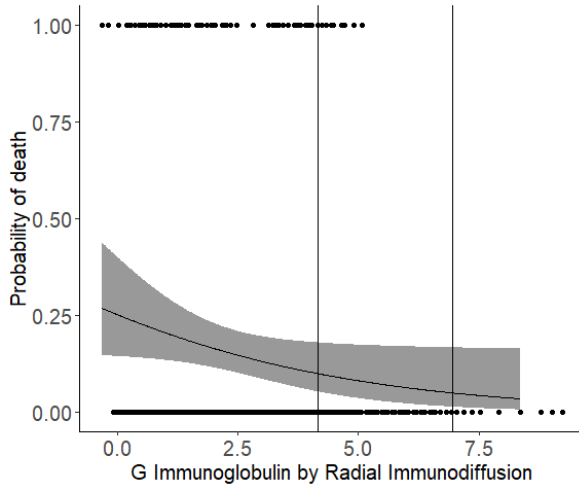


Figura 4. Regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e concentração de imunoglobulina pela IDR (amostra de soro às 48 horas de idade). A linha mais à direita representa o ponto de corte para a mortalidade de 5% e a linha mais à esquerda representa o ponto de corte para a mortalidade de 10%.

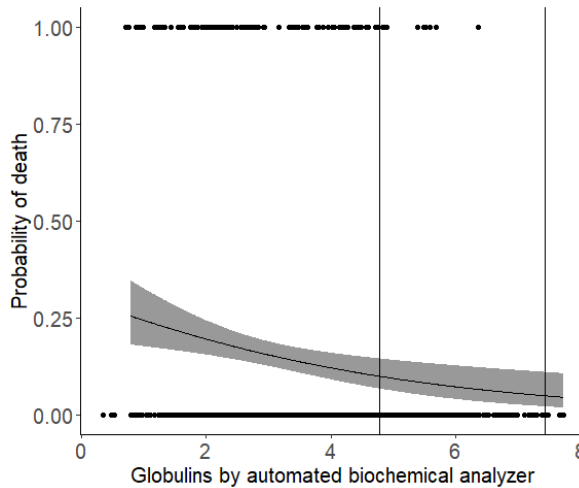


Figura 5. Regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e concentração de globulina em analisador bioquímico automático (amostra de soro às 48 horas de idade). A linha mais à direita representa o ponto de corte para a mortalidade de 5% e a linha mais à esquerda representa o ponto de corte para a mortalidade de 10%.

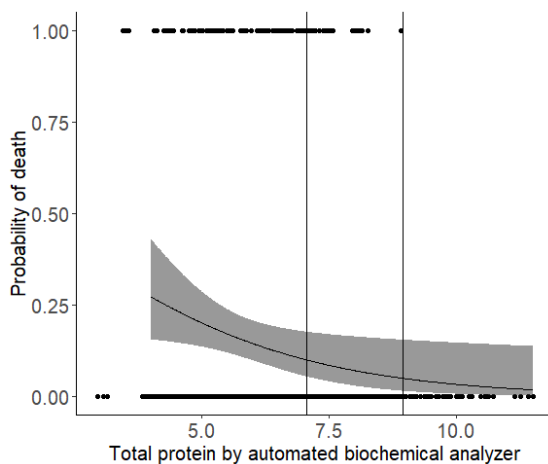


Figura 6. Regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e concentração de proteína total em analisador bioquímico automático (amostra de soro às 48 horas de idade). A linha mais à direita representa o ponto de corte para a mortalidade de 5% e a linha mais à esquerda representa o ponto de corte para a mortalidade de 10%.

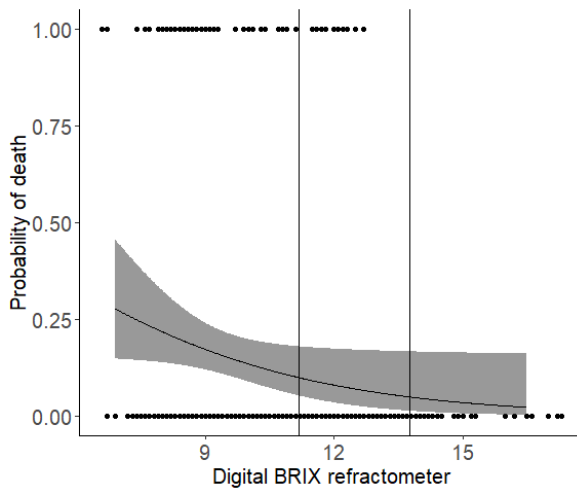


Figura 7. Regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e porcentagem Brix no refratômetro digital (amostra de soro às 48 horas de idade). A linha mais à direita representa o ponto de corte para a mortalidade de 5% e a linha mais à esquerda representa o ponto de corte para a mortalidade de 10%.

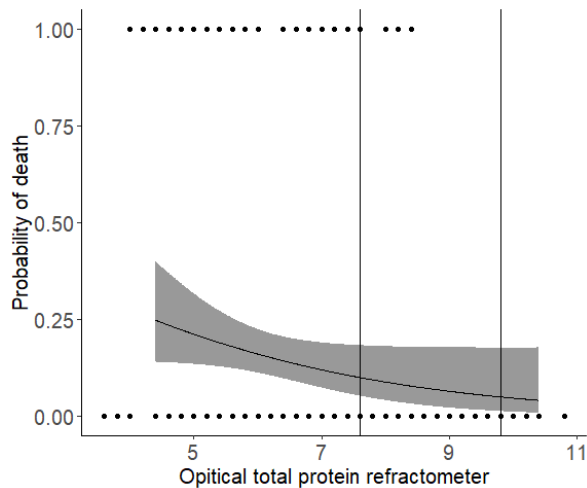


Figura 8. Regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e proteína total no refratômetro óptico (amostra de soro às 48 horas de idade). A linha mais à direita representa o ponto de corte para a mortalidade de 5% e a linha mais à esquerda representa o ponto de corte para a mortalidade de 10%.

As figuras de 4 a 8 apresentam as curvas de regressão logística entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e as variáveis IDR padronizada, Globulinas e Proteína Total em Analisador Bioquímico Automático, refratômetro digital Brix e refratômetro óptico de Proteína Total. Os pontos representam os indivíduos. Pontos na altura do valor 1 são indivíduos que morreram e pontos na altura do valor zero são indivíduo vivos. As duas linhas verticais representam os pontos de corte de 10% (linha mais à esquerda) e 5% de mortalidade.

A Tabela 2 apresenta as Odds Ratio (OR) calculadas com base na mortalidade e para IDR padronizada, Proteína Total e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático, refratômetro digital Brix e refratômetro óptico de Proteína. A OR calculada a partir da mortalidade foi de 0,77 para a IDR Padronizada, 0,75 para as Globulinas em

analisador bioquímico automático, 0,67 para a Proteína Total em analisador bioquímico automático, 0,75 para o refratômetro digital Brix, 0,71 para o refratômetro óptico de Proteína Total e 0,71 para o refratômetro óptico de Proteína Total, indicando que a cada incremento de uma unidade de variável a chance de morte diminui 23%, 25%, 33%, 25%, 29% e 29%, respectivamente. O valor de OR foi significativo para todas as variáveis.

Tabela 2. *Odds Ratio* (OR) calculadas com base na mortalidade para Imunodifusão Radial (IDR) padronizada, Proteína Total (PT) e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA), refratômetro digital Brix, refratômetro óptico de Proteína Total e refratômetro digital de Proteína Total.

	Odds ratio para mortalidade	Limite Inferior do Odds ratio	Limite superior do Odds ratio
IDR Padronizada	0,77	0,58	0,98
Globulinas ABA	0,75	0,63	0,90
PT ABA	0,67	0,46	0,93
Refrat. Brix Digital	0,75	0,55	0,97
Refrat. PT Óptico	0,71	0,49	0,99
Refrat. PT Digital	0,71	0,50	0,97

Abaixo, nas Tabelas de 3 a 7, são apresentados, na segunda coluna, o número médio de tratamentos (*i.e.*, morbidade) estimado pelo modelo de regressão para distintos valores da variável preditora e o valor *p* da significância da regressão, assim como um valor do coeficiente de determinação (R^2), que evidencia a qualidade do ajuste. O gráfico ao lado de cada tabela apresenta os dados reais e a reta ajustada, com o seu erro padrão. Todos os modelos de regressões apresentados foram significativos, porém apresentaram coeficientes de determinação baixos, indicando que, isoladamente, não são capazes de explicar o número de tratamentos.

Tabela 3. Regressão logística entre número médio de tratamentos até 90 dias e imunoglobulinas pela Imunodifusão Radial (IDR) (amostra de soro às 48 horas de idade).

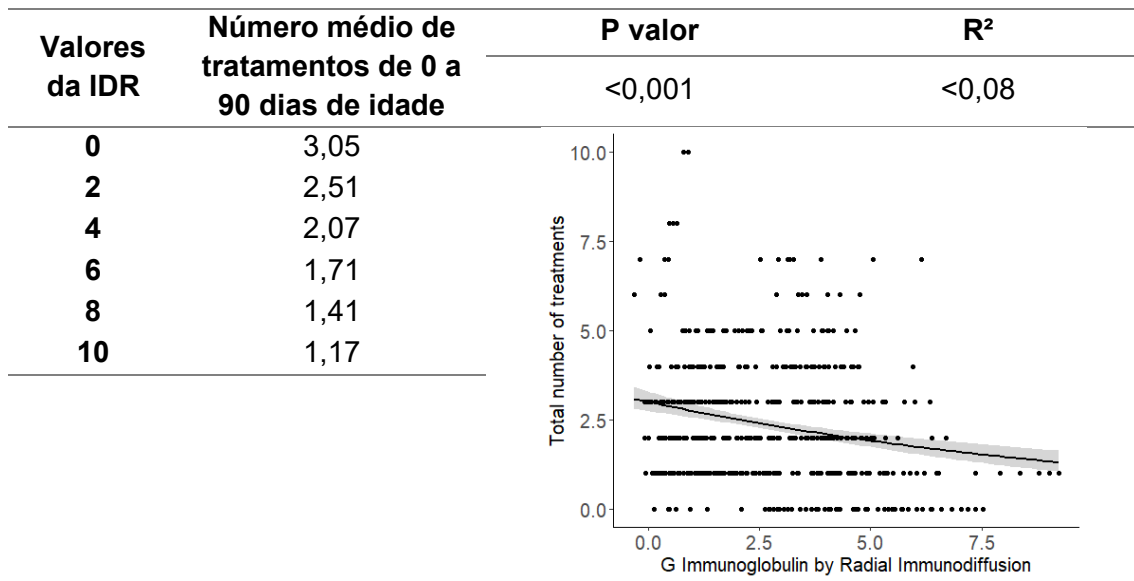


Tabela 4. Regressão logística entre número médio de tratamentos de até 90 dias e globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA) (amostra de soro às 48 horas de idade).

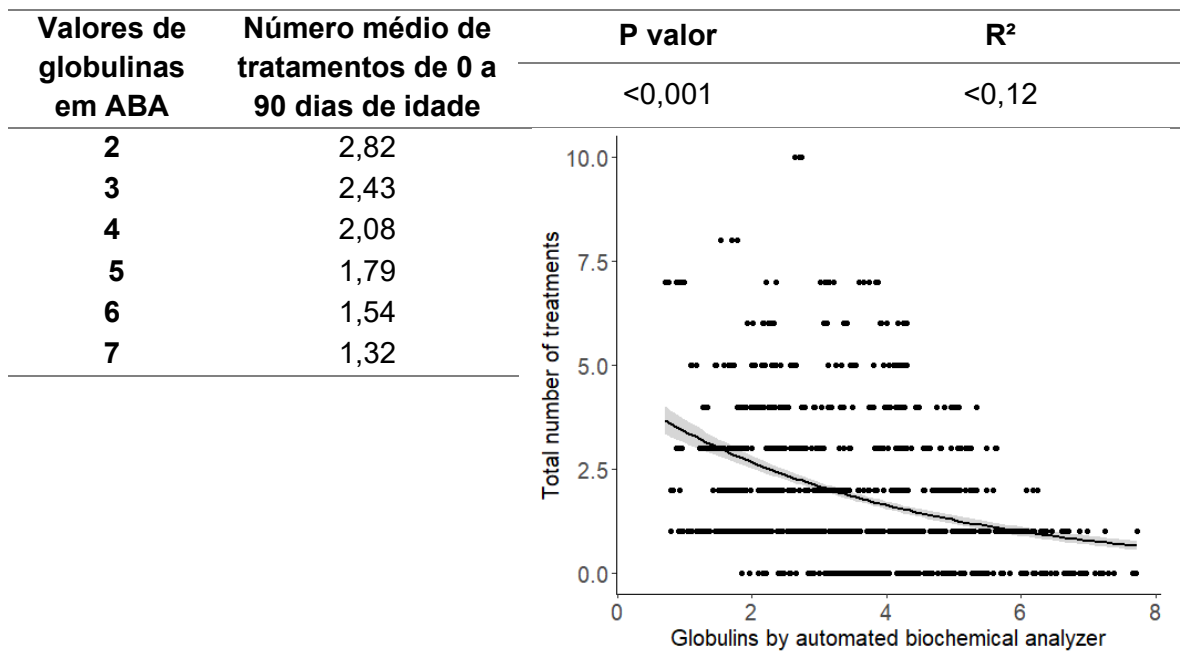


Tabela 5. Regressão logística entre número médio de tratamentos de até 90 dias e Proteína Total (PT) em Analisador Bioquímico Automático (amostra de soro às 48 horas de idade).

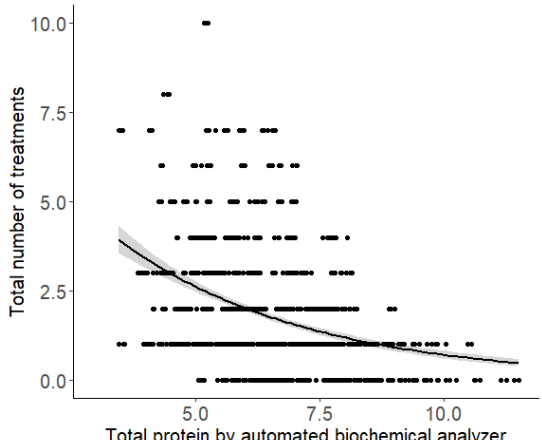
Valores de PT em Analisador Bioquímico Automático	Número médio de tratamentos de 0 a 90 dias de idade	P valor	R ²
		<0,001	<0,13
3	3,97		
5	2,81		
7	1,99		
9	1,41		
11	1,00		
13	0,71		

Tabela 6. Regressão logística entre número médio de tratamentos de até 90 dias e Porcentagem Brix em refratômetro digital (amostra de soro às 48 horas de idade).

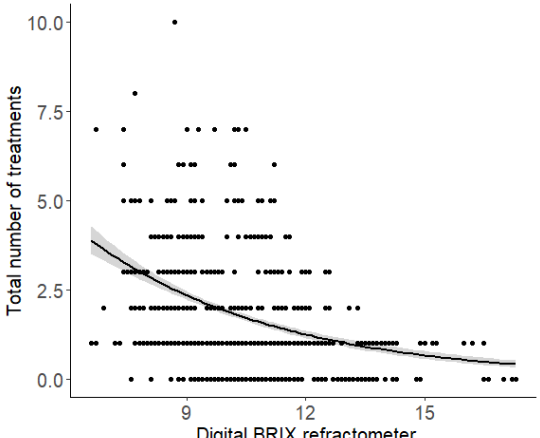
Valores de porcentagem Brix em refratômetro digital	Número médio de tratamentos de 0 a 90 dias de idade	P valor	R ²
		<0,001	<0,10
6	3,70		
8	2,91		
10	2,29		
12	1,81		
14	1,42		
16	1,12		

Tabela 7. Regressão logística entre número médio de tratamentos de até 90 dias e Proteína Total (PT) em refratômetro óptico (amostra de soro às 48 horas de idade).

Valores de PT no refratômetro óptico de	Número médio de tratamentos de 0 a 90 dias de idade	P valor	R ²
		<0,001	<0,12
4	3,50		
6	2,50		
8	1,79		
10	1,28		
12	0,91		

A *Odds Ratio* (OR) calculada a partir da morbidade foi de 0,9 para a IDR Padronizada, 0,86 para a Globulina Total em analisador bioquímico automático, 0,84 para a Proteína Total em analisador bioquímico automático, 0,89 para o refratômetro digital Brix e 0,85 para o refratômetro óptico de Proteína Total, indicando que a cada incremento de uma unidade de variável o número médio de tratamentos do bezerro até os 90 dias diminui 10%; 14%, 16%, 11% e 15%, respectivamente. Os dados são apresentados na Tabela 8.

A Tabela 9 apresenta os valores de referência para bezerros de 24 a 48 horas de idade, medida central e pontos de corte para mortalidade de 10% e 5% (metas para boa e excelente Transferência de Imunidade Passiva (TIP), respectivamente) para Imunodifusão Radial (IDR) padronizada *in house*, refratômetro óptico de Proteína Total, refratômetro digital de Proteína Total, refratômetro digital Brix, Proteína Total (PT), Albumina e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA).

Tabela 8. Odds Ratio (OR) calculadas com base no número de tratamentos (*i.e.*, morbidade) para Imunodifusão Radial (IDR) padronizada, Proteína Total (PT) e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA), refratômetro digital Brix e refratômetro óptico de Proteína Total.

	Odds ratio para morbidade	Limite Inferior do Odds ratio	Limite superior do Odds ratio
Imunodifusão Radial (IDR)	0,9	0,85	0,95
Globulinas em ABA	0,86	0,83	0,89
PT em ABA	0,84	0,78	0,9
Refratômetro digital Brix	0,89	0,84	0,94
Refratômetro óptico de PT	0,85	0,78	0,91

Tabela 9. Valores de referência para bezerros de 24 a 48 horas de idade, medida central e pontos de corte para mortalidade de 10% e 5% (metas para boa e excelente Transferência de Imunidade Passiva (TIP), respectivamente) para Imunodifusão Radial (IDR) padronizada *in house*, refratômetro óptico de Proteína Total, refratômetro digital de Proteína Total, refratômetro digital Brix, Proteína Total (PT), Albumina e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA).

	Valores de referência para bezerros de 24 a 48 horas de idade	Medida central	Ponto de corte para mortalidade de 10% - Meta para Boa TIP	Ponto de corte para mortalidade de 5% - Meta para Excelente TIP
Imunodifusão Radial (IDR)	0,09 - 6,78 g/dL	2,51 g/dL	4,16 g/dL (2,08 g/dL*)	6,96 g/dL (3,48 g/dL*)
Refratômetro óptico de Proteína Total	4,36 - 9,41 g/dL	6,59 g/dL	7,6 g/dL	9,81 g/dL
Refratômetro digital de Proteína Total	4,24 - 10,24 g/dL	6,82 g/dL	7,71 g/dL	9,92 g/dL
Refratômetro digital Brix	7,10 - 14,02 %	10,14%	11,18%	13,76%
Proteína Total em ABA	3,91 - 9,54 g/dL	6,29 g/dL	7,06 g/dL	8,95 g/dL
Albumina em ABA	2,28 - 3,48 g/dL	2,82 g/dL	-	-
Globulinas em ABA	1,18 - 6,66 g/dL	3,45 g/dL	4,79 g/dL	7,43 g/dL

*Considerando-se 50% do valor da IDR padronizada *in house* como concentração correta de IgG (BURTON *et al.*, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 2012; TÓTHOVÁ *et al.*, 2016).

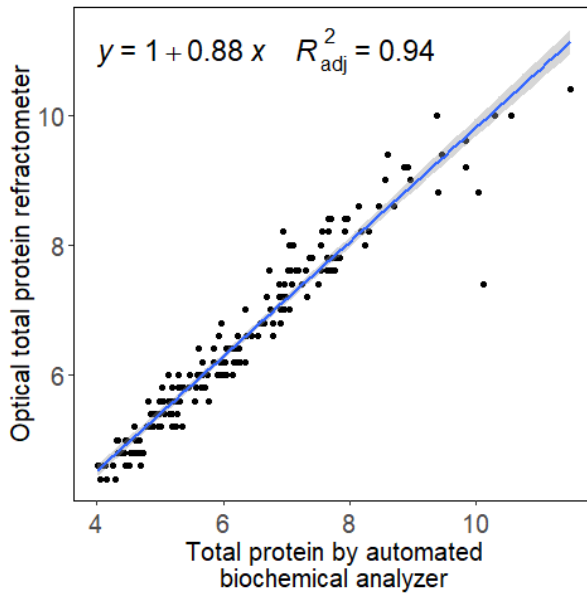


Figura 9. Regressão linear entre a Proteína Total em analisador bioquímico automático e refratômetro óptico de Proteína Total (amostra de soro às 48 horas de idade).

A Figura 9 mostra a regressão linear entre a Proteína Total em analisador bioquímico automático e refratômetro óptico de Proteína Total (amostra de soro às 48 horas de idade). O modelo de regressão foi significativo (valor $p < 0,001$) e observa-se que o valor indicado pelo refratômetro óptico superestima o valor de Proteína Total em analisador bioquímico automático. Para saber o valor real da Proteína Total a partir do resultado do refratômetro óptico é necessário calcular com a fórmula:

$$\text{Valor PT ABA (g/dl)} = (\text{PT Refratômetro óptico (g/dl)} - 1) / 0,88$$

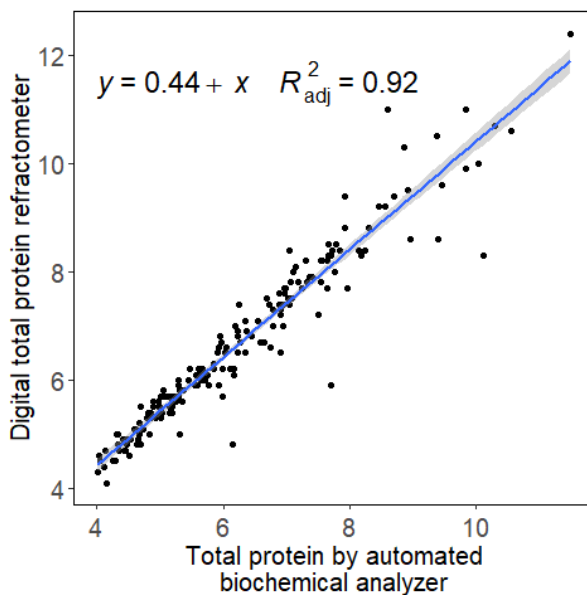


Figura 10. Regressão linear entre a Proteína Total em analisador bioquímico automático e refratômetro digital de Proteína Total (amostra de soro às 48 horas de idade).

A Figura 10 mostra a regressão linear entre a Proteína Total em analisador bioquímico automático e refratômetro digital de Proteína Total (amostra de soro às 48 horas de

idade). O modelo de regressão foi significativo (valor $p < 0,001$) e observa-se que o valor indicado pelo refratômetro digital superestima o valor de Proteína Total em analisador bioquímico automático em média 0,44 g/dL. Assim, para saber o valor real da Proteína Total a partir do resultado do refratômetro digital basta subtrair 0,44 ao resultado.

4.6. Discussão

4.6.1. Padrão-ouro para Transferência de Imunidade Passiva

Embora a Imunodifusão Radial (IDR) tenha sido realizada conforme instruções de Feinberg (1998), a pureza obtida para os inóculos e anti-IgG aparentemente não foram suficientes para determinar exclusivamente a IgG, conforme discutido no capítulo 2. A IDR apresentou média e desvio-padrão próximos aos valores de globulinas (IDR: $2,747 \pm 1,854$ g/dL; Globulinas: $3,557 \pm 1,435$ g/dL) (Tabela 1) e coeficiente de correlação de 0,87 (Figura 4), reiterando a hipótese de impureza dos reagentes da IDR.

Para melhor compreensão dos resultados do presente trabalho e comparação com outros, considerou-se, para alguns resultados, uma estimativa da IgG a partir do resultado da IDR padronizada *in house*. Considerando-se que as γ -globulinas compõem, em média, de 46 a 51% das globulinas de bezerros de até 48 horas de idade (BORGES *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2012; TÓTHOVÁ *et al.*, 2016) e que a imunoglobulina G compõe, em média, 90% das γ -globulinas nessa idade (BURTON *et al.*, 1989), estimou-se que o valor de IgG real da amostra seja 50% do resultado da IDR padronizada.

Diversas outras técnicas avaliam diretamente a imunoglobulina, como Imunoensaios Turbidimétricos (ALLEY; HAINES; SMITH, 2012; ELSOHABY; KEEFE, 2015), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)(GELSINGER *et al.*, 2015), eletroforese (PFEIFFER *et al.*, 1977), método espectroscópico de infravermelho por Transmissão e por Refletância Total Atenuada (ATR)(ELSOHABY *et al.*, 2015, 2016) e o Teste da Imunoglobulina G por Trealase Dividida (STIGA)(DRIKIC *et al.*, 2018). Sendo assim, caso se deseje avaliar especificamente a IgG dos bezerros, já existem técnicas mais avançadas e que devem ser utilizadas em substituição à IDR.

Entretanto, propõe-se no presente trabalho, a avaliação das globulinas como padrão-ouro para a avaliação da TIP, uma vez que dosar exclusivamente uma classe de imunoglobulinas provavelmente não represente com fidelidade a transferência da imunidade passiva em bezerros neonatos.

Tóthová *et al.* (2016), avaliando o perfil de proteínas por eletroforese de 7 bezerros desde o nascimento até 30 dias de vida, observaram variação nas frações de globulinas entre o dia 0 e o dia 2. Houve diferença estatística entre o dia 0 e o dia 2 para a Proteína Total ($4,11 \pm 0,37$ g/dL no dia 0 e $8,27 \pm 0,77$ g/dL no dia 2; $p < 0,001$), α_1 -globulina ($1,13 \pm 0,08$ g/dL no dia 0 e $1,26 \pm 0,06$ g/dL no dia 2; $p < 0,05$), β_2 -globulina ($0,05 \pm 0,01$ g/dL no dia 0 e $0,8 \pm 0,18$ g/dL no dia 2; $p < 0,05$) e γ -globulina ($0,05 \pm 0,02$ g/dL no dia 0 e $2,84 \pm 0,55$ g/dL no dia 2; $p < 0,001$), porém não foi observado o mesmo para a Albumina ($2,39 \pm 0,3$ g/dL no dia 0 e $2,08 \pm 0,16$ g/dL no dia 2; $p > 0,05$), α_2 -globulina ($0,14 \pm 0,05$ g/dL no dia 0 e $0,33 \pm 0,05$ g/dL no dia 2; $p > 0,05$) e β_1 -globulina ($0,35 \pm 0,08$ g/dL no dia 0 e $0,95 \pm 0,25$ g/dL no dia 2; $p > 0,05$). Feitosa *et al.* (2001) observaram resultados semelhantes, encontrando diferença estatística ($p < 0,05$) entre a Proteína Total, β -globulina e γ -globulina entre bezerros que apresentaram FTIP e que não apresentaram FTIP ($4,71 \pm 0,84$ g/dL e $7,02 \pm 0,96$ g/dL; $0,57 \pm 0,19$ g/dL e $0,93 \pm 0,28$ g/dL e $0,65 \pm 0,50$ g/dL e $2,51 \pm 0,82$ g/dL, respectivamente), porém não observaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre a Albumina e α -globulina entre os grupos ($2,52 \pm 0,35$ g/dL e $2,64 \pm 3,35$ g/dL e $0,97 \pm 0,20$ g/dL e $0,94 \pm 0,28$ g/dL, respectivamente).

Sendo assim, há absorção de outras proteínas que compõem o soro do bezerro, além das imunoglobulinas, e essas também estão associadas à imunidade do bezerro neonato. Por exemplo, a β_2 -globulina apresentou um aumento de 10 vezes e, foi associado pelos autores do trabalho com a absorção de Lactoferrina, um componente bioativo do colostro que possui ação antimicrobiana (GODDEN, 2008). Nesse sentido, a utilização das globulinas como padrão-ouro para a TIP parece mais adequado por englobar a totalidade de proteínas que de fato foram absorvidas do colostro e que apresentam função importante na imunidade do bezerro neonato.

Além disso, no presente trabalho, o coeficiente de variação intra-indivíduos foi de 0,15 para a IDR e 0,06 para as Globulinas no analisador bioquímico automático, demonstrando maior acurácia da segunda técnica. A determinação das proteínas

totais e frações está altamente difundida nos laboratórios e apresenta alta acurácia, podendo vir a ser levada ao campo, tornando-a uma ferramenta de monitoramento para a TIP, sendo, portanto, mais interessante como padrão-ouro para a avaliação da TIP em bezerros.

Comparando-se a Figura 5 com a Figura 6 é possível observar que as regressões logísticas apresentaram padrão similar para a IDR e Globulinas em relação à mortalidade. Essa condição se repete para as regressões logísticas para a IDR e Globulinas em relação ao número de tratamentos (Tabela 3 e 4, respectivamente), sendo que o coeficiente de determinação foi maior para globulina que para IDR, indicando que a globulina explica uma parcela maior dos resultados comparado à IDR.

4.6.2. Importância da Transferência de Imunidade Passiva em bezerros em condições tropicais de criação

As Figuras 5 a 9 apresentam as regressões logísticas entre probabilidade de mortalidade até 90 dias de idade e os resultados de concentração de imunoglobulina na IDR padronizada, Globulinas e Proteína Total em Analisador Bioquímico Automático, porcentagem Brix em refratômetro digital e Proteína Total em refratômetro óptico em analisador bioquímico automático em amostras de soro de bezerros entre 24 e 48 horas de idade. Nota-se, para todas as técnicas utilizadas, que em uma determinada concentração não há mais observação de mortes indicando uma condição de proteção relacionada à TIP. Os resultados da Tabela 2 confirmam essa hipótese. Para cada aumento de 1,0 g/dL de imunoglobulina na IDR, a chance de morte do bezerro até os 90 dias diminui 23%; para cada aumento de 1,0 g/dL de Globulinas, a chance de morte reduz 25%; para cada aumento de 1,0 g/dL de Proteína Total, a chance de morte reduz 33%; para cada aumento de 1% na porcentagem Brix do refratômetro digital, a chance de morte reduz 25% e para cada aumento de 1,0 g/dL de Proteína Total no refratômetro óptico, a chance de morte diminui 29%. Esses resultados vão ao encontro da maior parte dos resultados observados na literatura.

Em estudo realizado por Penhale *et al.* (1970), a maioria dos bezerros com menos de 0,2 g/dL IgG no plasma morreu e bezerros com níveis plasmáticos de IgG maiores que 0,6 g/dL não apresentaram septicemia. Tyler *et al.* (1998), avaliando dados de 3479 bezerros até 7 dias de idade, observaram que bezerros com Proteína Total em

refratômetro óptico menor que 4 g/dL possuíam 4,6 vezes mais risco relativo para mortalidade que bezerros com Proteína Total maior que 6 g/dL. Donovan *et al.* (1998) observaram curva semelhante às do presente estudo demonstrando o modelo ajustado da associação entre Proteína Total sérica e risco de mortalidade em 3103 da raça Holandesa. Os autores ressaltaram o fator protetivo da absorção de imunoglobulinas do colostro, sendo que bezerros que apresentaram Proteína Total menor que 5,0 g/dL possuíam 3 a 6 vezes mais chances de morrer até os seis meses de idade que os demais, além disso, o menor risco para mortalidade foi associado a Proteína Total maior que 6,5 g/dL. Chigerwe; Hagey e Aly (2015), avaliando resultados de amostra de soro de 1290 bezerros de 2 dias de idade, observaram razão de probabilidade de 0,89 (0,77 – 0,96) para mortalidade em bezerros que apresentaram IgG entre 2,0 e 2,5 g/dL, indicando que essas concentrações de IgG favoreceram a ausência de mortalidade nesses animais. Segundo metanálise realizada por Raboisson; Trillat e Cahuzac (2016), avaliando 28 modelos de 10 publicações, observou-se um risco médio (DP) de mortalidade associado ao FTIP de 4,87 (7,62).

Entretanto, Windeyer *et al.* (2014) avaliando 2874 resultados de Proteína Total sérica em refratômetro digital de bezerros até sete dias de idade de 19 fazendas canadenses e estadunidenses, não encontraram associação entre a FTIP e a mortalidade, sugerindo que a mortalidade é multifatorial e que, para essas fazendas (possivelmente bem manejadas e com baixo desafio, uma vez que a mortalidade até três meses de idade foi de 3,5%) a TIP não influencia sobremaneira na morte desses animais. Os resultados do presente trabalho confirmam que, em condições tropicais, onde os desafios associados às doenças são altos, a TIP representa um importante fator de proteção para os bezerros até os 90 dias de idade.

Com relação à morbidade (considerada, no presente estudo, como número de tratamentos), as Tabelas 3 a 7 apresentam as regressões logísticas entre probabilidade de número de tratamentos (*i.e.*, morbidade) até 90 dias de idade e os resultados de concentração de imunoglobulina na IDR padronizada, Globulinas e Proteína Total em Analisador Bioquímico Automático, porcentagem Brix em refratômetro digital e Proteína Total em refratômetro óptico de em analisador bioquímico automático em amostras de soro de bezerros entre 24 e 48 horas de idade. Nota-se significância entre as correlações ($p < 0,001$), porém, devido à elevada variabilidade dos dados, os valores de coeficiente de determinação foram baixos. Os

resultados indicam, portanto, que a TIP não é o único fator que explica a morbidade, uma vez que se trata de uma condição multifatorial. Tyler *et al.* (1998) consideram que para cada fazenda, os fatores de manejo, ambientais e patógenos se combinam para determinar o risco de mortalidade basal experimentado pelos bezerros com status ótimo TIP e os bezerros com TIP abaixo do ideal sofrerão um risco aumentado de mortalidade em relação à taxa de mortalidade individual da fazenda. Além disso, os autores ponderam que o ponto de corte de mortalidade varia de fazenda para fazenda, porém é necessário lembrar que uma TIP aprimorada não compensará higiene inadequada.

Observa-se na Tabela 8 que para cada aumento de 1,0 g/dL de imunoglobulina na IDR, o número médio de tratamentos do bezerro até os 90 dias diminui 10%; para cada aumento de 1,0 g/dL de Globulina, o número médio de tratamentos do bezerro até os 90 dias diminui 14%; para cada aumento de 1,0 g/dL de Proteína Total, o número médio de tratamentos do bezerro até os 90 dias diminui 16%; para cada aumento de 1% na porcentagem Brix em refratômetro digital, o número médio de tratamentos do bezerro até os 90 dias diminui 11% e para cada aumento de 1,0 g/dL de Proteína Total no refratômetro óptico, o número médio de tratamentos do bezerro até os 90 dias diminui 15%. Nesse sentido, além do benefício direto do aumento da saúde do rebanho, a adequada TIP pode auxiliar na redução do uso de antibióticos (BERGE *et al.*, 2005), o que vai ao encontro das demandas mundiais por redução no uso dessas medicações para o benefício da Saúde Única, a fim de reduzir a ocorrência de resistência aos antimicrobianos (O'NEILL, 2016) e, ainda, gera economia pela redução nos custos com esse produto.

No presente estudo optou-se por realizar uma análise geral da morbidade, mas considerando-se a ocorrência das doenças a cada mês, observou-se que a diarreia foi a mais prevalente no primeiro mês de vida (61%; $p < 0,001$) seguido da pneumonia (21%; $p < 0,001$). A pneumonia foi a doença mais prevalente no segundo e terceiro meses (94% e 88%, respectivamente; $p < 0,001$), já a tristeza parasitária bovina foi a segunda doença mais prevalente no terceiro mês (11%; $p < 0,001$).

Esses resultados podem ajudar a explicar a diferença observada na comparação dos limites inferiores e superiores das OR para mortalidade e morbidade. Observa-se que a variação para a OR da mortalidade foi maior que a variação da OR para a

morbidade, sugerindo que a TIP impacta mais na mortalidade que na morbidade. Possivelmente esse resultado se dá pela influência da diarreia na morbidade, que foi a enfermidade mais frequente no primeiro mês de vida, e da pneumonia na mortalidade, que foi a segunda enfermidade mais frequente no primeiro mês de vida e a mais frequente no segundo e terceiro mês de vida.

Carvalho (2017), ao avaliar o comportamento da concentração de IgG até 31 dias de idade em amostras de soro de 23 bezerros demonstrou que a IgG anti *Cryptosporidium parvum* não conferiu proteção aos bezerros para essa enfermidade, sugerindo que a imunidade contra os agentes causadores de diarreia é principalmente local (IgA no lúmen intestinal) e não sistêmica (IgG na circulação sanguínea). Nesse sentido, a TIP não auxilia tanto na redução da diarreia, sendo mais efetivo para o controle dessa enfermidade a higiene para redução do desafio aos bezerros, pois assim se diminui a carga de agentes no ambiente, fômites e nos alimentos (leite e água). A mortalidade, por sua vez, foi influenciada de forma mais significativa pela TIP, provavelmente devido a pneumonia que é mais associada à resposta imune sistêmica (SACCO *et al.*, 2012).

Em metanálise realizada por Raboisson; Trillat e Cahuzac (2016), a associação entre FTIP e diarreia foi relatada em 5 modelos de 2 publicações e o risco médio (DP) de diarreia associado à FTIP foi de 1,71 (0,70). Já a associação entre FTIP e doença respiratória bovina foi relatada em 12 modelos de 5 publicações e o risco médio (DP) de doença respiratória bovina associado à FTIP foi de 2,24 (1,20). Furman-Fratczak, Rzasa e Stefaniak (2011), estudando 175 bezerros, observaram que a incidência de doenças foi de 81,8% para animais com IgG menor que 0,5 g/dL e 26,7% para animais com IgG maior que 1,5 g/dL e que esses animais não apresentaram doença respiratória até o 28º dia de idade. Já no estudo de Windeyer *et al.* (2014), observou-se que mais que 20% dos casos de doença respiratória bovina seriam potencialmente evitados pela eliminação da FTIP.

Lora *et al.* (2018), observando 78 bezerros até os 30 dias de idade relatou que os bezerros com FTIP (IgG menor que 1,0 g/dL) apresentavam 24 (3–231; intervalo de confiança de 95%)($p < 0,05$) vezes mais chances de adoecerem que bezerros com adequada TIP. Além disso, esses animais adoeciam mais cedo que aqueles que não possuíam FTIP (6 dias antes) e possuíam maior risco para infecções entéricas por

rotavírus (OR=12) e *Cryptosporidium* spp. (OR=9) (agentes patogênicos causadores de diarreia) e maior risco para morte (OR=11). Tais resultados sugerem que a pneumonia é mais influenciada pela TIP que a diarreia e essa condição pode afetar a morbidade e a mortalidade.

Em suma, os resultados de mortalidade e morbidade do presente trabalho deixam claro que também em condições de criação tropicais há uma oportunidade de melhoria nos sistemas de produção de bezerros a partir do adequado manejo de colostragem, pois o correto manejo dos animais nos primeiros dias de idade favorecem a saúde e sobrevivência do bezerro, tornando o sistema mais produtivo e rentável.

4.6.3. Valores de Referência para bezerros de 24 a 48 horas de idade, pontos de corte para Transferência de Imunidade Passiva para condições de criação em clima tropical

Dada a heterogeneidade dos dados do presente estudo (observada nas Figuras 2 e 3), calculou-se os valores de referência para bezerros de 24 a 48 horas de idade e os pontos de corte para as diferentes técnicas de avaliação da TIP utilizadas no estudo com base nos resultados de mortalidade de 5% e 10% (metas para boa e excelente TIP, respectivamente) (Tabela 9).

Observa-se limites inferiores de Proteína Total muito baixos, independente da técnica utilizada (limites inferiores de 4,36, 4,24 e 3,91 g/dL, em refratômetro óptico, refratômetro digital e analisador bioquímico automático, respectivamente). Esses valores foram menores que os valores de referência para bovinos adultos (limite inferior de 5,7 g/dL) e bezerros (limite inferior de 5,9 g/dL)(ROSENBERGER, 1993; CONSTABLE *et al.*, 2016), coerentemente ao que é relatado na literatura, pois os bezerros nascem hipogamaglobulinêmicos e são dependentes da ingestão do colostro para absorver as imunoglobulinas (MCGUIRK; COLLINS, 2004; GODDEN, 2008). Ao nascimento, os bezerros possuem apenas albumina e pequenas quantidades de α -globulinas e β -globulinas (TÓTHOVÁ *et al.*, 2016). Assim, bezerros que apresentam FTIP, possuirão valores baixos de Proteína Total nos dois primeiros dias de vida e, embora não seja clinicamente interessante para o bezerro, são valores possíveis de serem observados, principalmente para bezerros que não tem a colostragem assistida.

A condição oposta também foi observada: valores de Proteína Total bastante elevados independente da técnica utilizada (limites superiores de 9,41, 10,24 e 9,54 g/dL, em refratômetro óptico, refratômetro digital e analisador bioquímico automático, respectivamente). Esses valores estavam acima dos valores de referência para bovinos adultos (limites superiores de 8,0 g/dL) e bezerros (limites superiores de 7,0 g/dL) (CONSTABLE *et al.*, 2016; ROSENBERGER, 1993).

Resultados similares foram relatados em outros estudos que avaliaram a proteína total de bezerros de até dois dias de idade (MACHADO-NETO; PACKER; SUSIN, 1986; DANIELE *et al.*, 1994; PAULETTI *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2012; TODD *et al.*, 2018). Pauletti *et al.* (2003) observaram média de 8,998 g/dL de Proteína Total em animais com elevada TIP no primeiro dia de vida, porém esse valor decai progressivamente até atingir a normalidade para bovinos adultos aos 15 dias de idade.

Teixeira *et al.* (2012) observaram o mesmo padrão em bezerros de 24 a 36 horas de idade apresentando média de 8,97 g/dL de Proteína Total e queda do valor para 7,44 g/dL (média) aos 15 dias de idade. Esse pico de Proteína Total no segundo dia de idade ocorre devido à abertura do intestino do bezerro neonato à passagem não seletiva de imunoglobulinas durante as primeiras horas de vida (BUSH; STALEY, 1980; BESSI *et al.*, 2002). Caso esse bezerro ingira colostro de elevada qualidade imunológica (IgG do colostro maior que 50 g/L) e/ou em grandes volumes enquanto o intestino ainda estiver aberto à absorção de macromoléculas (Proteínas), uma grande quantidade de proteínas alcançará sua circulação e, assim, a Proteína Total ao segundo dia será elevada. Contudo, como as proteínas no sangue apresentam importante papel de osmolaridade (KANECO; HARVEY; BRUSS, 2008), a presença excessiva dessas na circulação por um longo período de tempo seria prejudicial ao bezerro, de modo que o organismo promove o catabolismo dessas proteínas, garantindo a homeostasia na circulação sanguínea (BUSH; STALEY, 1980; DANIELE *et al.*, 1994).

Alguns autores consideram que proteínas elevadas estão associadas à desidratação e que portanto não devem ser consideradas para a avaliação da TIP, por apresentarem o potencial de classificar erroneamente os animais nesse sentido (aumentando a proporção de falso-positivos) (TYLER *et al.*, 1996, 1999; BUCZINSKI *et al.*, 2018; ELSOHABY *et al.*, 2019b). Contudo, no presente estudo observou-se que,

para bezerros de 24 a 48 horas de idade, concentrações elevadas de Proteína Total estão associadas à uma condição de excelente TIP. Renaud *et al.* (2018), avaliando clinicamente para desidratação 149 bezerros, não observaram interferência da desidratação nas concentrações séricas de IgG e Proteína Total.

Observa-se na Tabela 1 que a Proteína Total apresentou média e desvio-padrão de $6,394 \pm 1,438$ g/dL (mínimo de 2,96 g/dL e máximo de 11,5 g/dL). A Proteína Total (PT) do soro é constituída por diversos tipos de proteínas, sendo a Albumina a mais prevalente, constituindo de 35 a 50% das proteínas do soro.

A Albumina é um componente bastante estável na circulação e, em bezerros nos primeiros dias de idade, é observada em concentrações próximas de 2,5 a 3,0 g/dL (BORGES *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2012; ELSOHABY *et al.*, 2019b). No presente trabalho a Albumina apresentou média e desvio-padrão de $2,838 \pm 0,312$ g/dL (Tabela 1), com valores de referência para bezerros de 24 a 48 horas de idade variando de 2,28 a 3,48 g/dL (Tabela 9). Além da Albumina, as α -globulinas, β -globulinas e γ -globulinas (IgG, IgA, IgM, IgE e IgD), compõem o restante da proteína total – as chamadas Globulinas (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). A concentração média de α -globulinas e β -globulinas é de 1,0 g/dL (0,7 a 1,3 g/dL) e 0,6 g/dL (0,5 a 1,0 g/dL), respectivamente (ROSENBERGER, 1993; BORGES *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2012), e essas sofrem variações, embora pequenas, quanto à absorção de colostro (TÓTHOVÁ *et al.*, 2016).

No presente estudo, as globulinas apresentaram média e desvio-padrão de $3,557 \pm 1,435$ g/dL (mínimo de 0,36 g/dL e máximo de 7,72 g/dL) (Tabela 1) e valores de referência para bezerros de 24 a 48 horas de idade variando de 1,18 a 6,66 g/dL (Tabela 9). As imunoglobulinas, por sua vez apresentaram média e desvio-padrão de $2,747 \pm 1,854$ g/dL (mínimo de 0,01 g/dL e máximo de 9,225 g/dL) (Tabela 1) e valores de referência para bezerros de 24 a 48 horas de idade variando de 0,09 a 6,78 g/dL (Tabela 9). Em estudo realizado por Burton *et al.* (1989), ao avaliar o perfil de imunoglobulinas (γ -globulinas) de 156 bezerros de 24 a 36 horas de idade pela técnica de IDR específica para IgG, IgA e IgM, observou-se concentrações médias e desvio-padrão de $1,801 \pm 1,534$ g/dL, $0,11 \pm 0,086$ g/dL e $0,154 \pm 0,132$ g/dL, respectivamente, totalizando uma média de imunoglobulinas de 2,065 g/dL podendo variar entre 0,313 e 3,817 g/gl. Contudo, como já discutido acima, a IDR padronizada

in house, não apresentou pureza suficiente para garantir que apenas a IgG fosse quantificada pela técnica, como era esperado.

Estimou-se, com base nos valores de referência apresentados na literatura (BORGES *et al.*, 2001; BURTON *et al.*, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 2012; TÓTHOVÁ *et al.*, 2016), que o valor de IgG real da amostra seja 50% do resultado da IDR padronizada. Mais estudos serão realizados para confirmação dessa hipótese. Considerando esse fator de correção, o presente estudo encontrou valores próximos aos valores observado por Burton *et al.* (1989), concentrações médias e desvio-padrão de $1,374 \pm 0,927$ g/dL IgG.

Classicamente, a FTIP é definida como uma concentração sérica de IgG menor que 1,0 g/dL em bezerros entre 1 e 7 dias de idade (TYLER *et al.*, 1996; WEAVER *et al.*, 2000; MCGUIRK; COLLINS, 2004; GODDEN, 2008). Entretanto, esse ponto de corte vem sendo questionado, e alguns autores sugerem pontos de corte mais elevados, como 1,5 g/dL (DAVIS; DRACKLEY, 1998) ou de 2,0 g/dL à 2,5 g/dL (CHIGERWE; HAGEY; ALY, 2015).

Até o presente momento, não havia sido realizado estudos do ponto de corte para a FTIP em condições de clima tropical de criação de bezerros e o presente trabalho objetivou preencher essa lacuna. Calculou-se, com base na mortalidade de 5% e 10% os pontos de corte utilizando diferentes técnicas de diagnóstico para TIP e esses resultados podem ser observados nas linhas das Figuras 5 a 9 e na Tabela 9. Considerou-se o ponto de corte para mortalidade de 10% como uma meta para boa TIP, uma vez que ele se aproxima do valor de IgG de 2 g/dL, que é o ponto de corte para falha determinado por Chigerwe, Hagey e Aly (2015). Segundo esses autores, o ponto de corte de 2,0 a 2,5 g/dL de IgG, bastante superiores às recomendações clássicas de 1,0 g/dL de IgG (TYLER *et al.*, 1996; WEAVER *et al.*, 2000; MCGUIRK; COLLINS, 2004; GODDEN, 2008), são mais coerentes com os desafios impostos pelos sistemas de criação atuais.

Resultado similar foi observado por Feitosa *et al.* (2001), que acompanhando 40 bezerras criadas em condições tropicais (Araçatuba - SP) e avaliando a Proteína Total e frações do soro no primeiro dia de idade, observaram mortalidade de 18,4% dos animais por causas infecciosas, sendo que esses animais que morreram

apresentaram média e desvio-padrão de concentração de Proteína Total de $4,17 \pm 0,84$ g/dL e γ -globulinas de $0,65 \pm 0,50$ g/dL, já para os bezerros que sobreviveram, $7,02 \pm 0,96$ g/dL e $2,51 \pm 0,82$ g/dL, respectivamente.

No entanto, o que pode ser um ponto de corte excelente para condições de clima temperado, não necessariamente o será para condições de clima tropical. No presente estudo isso se confirma, uma vez que para garantir que a mortalidade esteja nos níveis recomendados (<5%), estimou-se que é necessário que o bezerro apresente concentração de IgG igual ou superior à 3,48 g/dL (ponto de corte para mortalidade de 5% corrigido na Tabela 9). Nesse sentido, para condições tropicais que impõem desafios elevados aos bezerros neonatos, como por exemplo, ambientes com altas cargas parasitárias, estresse térmico associado à elevada amplitude térmica (dias quentes e noites frias) e infestações elevadas de carrapatos e moscas, garantir uma excelente TIP se torna fundamental para auxiliar a resposta imune do bezerro e favorecer sua condição de saúde e sobrevivência.

Sendo assim, é possível calcular o volume de colostro que deve ser ingerido por um bezerro de 40 kg para que adquira o volume desejado de IgG seguindo cálculo apresentado por Quigley (2002).

Considerando que o volume de plasma do bezerro é 9,0% do peso vivo, temos que um bezerro de 40 kg apresenta 3,6L de plasma. Se desejamos que o bezerro absorva 2 g/dL de IgG (e obtenção de 7,0 g/dL de Proteína Total às 48 horas de idade), esse animal necessita ingerir, ao todo, 72g de IgG. Se a eficiência de absorção das imunoglobulinas é de, aproximadamente, 25%, é necessário que o bezerro ingira 4 vezes esse valor. Portanto, o volume total que o bezerro irá ingerir de colostro precisa apresentar 288 g de IgG. Considera-se atualmente que um bom colostro apresenta 50 g/L de IgG. Seriam necessários, portanto, que o bezerro ingerisse 5,76L de um colostro de boa qualidade para adquirir uma boa Transmissão de Imunidade Passiva. Contudo, esse volume é impraticável, pois um bezerro neonato não consegue ingerir tanto colostro de uma só vez. De um modo geral, são fornecidos 4L de colostro para os bezerros e, nesse sentido, seria necessário que o colostro apresentasse 72 g/L de IgG. Assim, um colostro de boa qualidade deve apresentar, segundo o presente cálculo, aproximadamente 70 g/L de IgG, ou seja, deve apresentar 24% Brix (tanto no

refratômetro óptico quanto no digital), segundo formula de regressão apresentada por Biemann *et al* (2010).

Pensando-se no fornecimento de 3,5 g/dL de IgG a fim de obter uma excelente colostragem (e obtenção de 9,0 g/dL de Proteína Total às 48 horas de idade), seria necessário que o bezerro ingerisse 126 g de IgG. Considerando a eficiência média de absorção das imunoglobulinas (25%), é necessário que o bezerro ingira 4 vezes esse valor. Portanto, o volume total que o bezerro irá ingerir de colostro precisa apresentar 504 g de IgG. Mantendo-se o fornecimento de 4L, o colostro precisaria conter 126 g/L de IgG, valor que não é impossível de ser observado, mas é raro. Sendo assim, caso se deseje atingir uma excelente colostragem é necessário fornecer o colostro em até duas horas após o nascimento, pois nesse período a eficiência de absorção das imunoglobulinas é maior, podendo chegar à 50%. Nessas condições, o colostro poderá conter 63 g/L de IgG, pois assim, o volume total que o bezerro irá ingerir de colostro apresentará 252 g de IgG.

Silper *et al.* (2012) observaram concentrações de imunoglobulinas nos colostros de 115 vacas Holandês x Gir variando de 51,4 a 105,8 g/L, indicando que, nas condições dos rebanhos brasileiros que são majoritariamente constituídos por animais mestiços, é possível alcançar níveis de colostragem excelentes. Mesmo considerando o gado Holandês puro é possível alcançar esses valores, Biemann *et al* (2010), por exemplo, observaram, ao avaliar 273 amostras de colostro de vacas da raça holandês, concentrações de IgG variando de 22,4 a 196,9 g/L, com média de 94,4 g/L, sendo que apenas 7,7% apresentaram valores menores que 50 g/L.

Os bezerros podem, segundo os resultados do presente estudo, ser classificados como: (1) mal colostrados (FTIP), apresentando concentração de IgG menores que 2,0 g/dL, Globulinas menores que 4,8 g/dL e Proteína Total menor que 7,0 g/dL; (2) bem colostrados (Boa TIP), apresentando concentração de IgG entre 2,0 g/dL e 3,4 g/dL, Globulinas entre 4,8 g/dL e 7,4 g/dL e Proteína Total entre 7,0 g/dL e 8,9 g/dL e (3) excelentemente colostrados (Excelente TIP), apresentando concentração de IgG igual ou superior à 3,5 g/dL, Globulinas igual ou superior à 7,4 g/dL e Proteína Total igual ou superior à 9,0 g/dL (Tabela 9).

Observou-se ainda, no presente estudo que os refratômetros, apesar de serem uma ferramenta útil para o campo, superestimaram os valores de Proteína Total. Isso poderia provocar falhas no diagnóstico da TIP nas fazendas, aumentando o número de falso negativos para FTIP, ou seja, animais que apresentam FTIP seriam diagnosticados como não apresentando FTIP devido à problemas relacionados ao equipamento. Quigley (2001) apontou a qualidade do instrumento, sua manutenção e calibração, temperatura da amostra, idade e estado de hidratação do bezerro como possíveis comprometedores do resultado da refratometria.

Sendo assim, calculou-se os pontos de corte para cada equipamento (Tabela 9) e as fórmulas para correção dos resultados. O ponto de corte para mortalidade de 10% (meta para Boa TIP) e 5% (meta para Excelente TIP) para o refratômetro óptico utilizado (refratômetro óptico para Proteína Total Mega Brix®, Modelo RHC-200AT; SC Metra S.R.L., Piata Cazarmii, Romênia) foram de 7,6 g/dL e 9,81 g/dL, respectivamente. É possível utilizar a fórmula de correção a seguir obtida pela regressão linear ilustrada na Figura 11 para ajustar o valor de Proteína Total do refratômetro óptico:

$$\text{Valor PT ABA (g/dl)} = (\text{PT Refratômetro óptico (g/dl)} - 1)/0,88$$

Já para o refratômetro digital utilizado (refratômetro digital para BRUX e Proteína Total Misco Palm Abbe digital refractometer PA203®) o ponto de corte para mortalidade de 10% (meta para Boa TIP) e 5% (meta para Excelente TIP) foram de 7,71 g/dL e 9,92 g/dL, respectivamente. Para corrigir o valor de Proteína Total do refratômetro digital basta subtrair o fator de correção 0,44 obtido pela regressão linear ilustrada na Figura 12.

Como cada refratômetro apresentará um fator de correção diferente, recomenda-se que antes do seu uso para o diagnóstico da TIP o mesmo seja testado (após correta calibração) comparando os resultados de 10 amostras de soro de bezerros de 24 a 48 horas de idade com os resultados de Proteína Total realizado em laboratório de confiança, utilizando a mesma amostra. Assim, é possível determinar o fator de correção do equipamento, e obtenção de resultados mais precisos.

4.7. Conclusão

A Imunodifusão Radial (IDR) está associada a muitas falhas metodológicas, comprometendo o diagnóstico da Transferência de Imunidade Passiva (TIP). A dosagem de Globulinas é mais representativa da TIP e deveria ser utilizada como técnica padrão-ouro para o tal diagnóstico. Em condições tropicais de criação de bezerros, os pontos de corte para Boa e Excelente TIP são, respectivamente, 7,0 g/dL e 9,0 g/dL para Proteína Total, 4,8 g/dL e 7,4 g/dL para Globulinas e 2,0 g/dL e 3,5 g/dL para IgG. Os refratômetros superestimaram as concentrações de Proteína Total, necessitando de um fator de correção para seu uso ou aumento no seu ponto de corte.

Referências

- ALLEY, M. L.; HAINES, D. M.; SMITH, G. W. Short communication: Evaluation of serum immunoglobulin G concentrations using an automated turbidimetric immunoassay in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4596–4599, 2012.
- BEAM, A. L. *et al.* Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3973–3980, 2009.
- BERGE, A. C. B. *et al.* A clinical trial evaluating prophylactic and therapeutic antibiotic use on health and performance of preweaned calves. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 6, p. 2166–2177, 2005.
- BESSI, R. *et al.* Colostral Antibodies Absorption in Calves. II. Distal Small Intestine Study. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2325–2331, 2002.
- BORGES, A. S. *et al.* Influência da forma de administração e da quantidade fornecida de colostro sobre a concentração de proteína total e de suas frações eletroforéticas no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 629–634, 2001.
- BUCZINSKI, S. *et al.* Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Accuracy of Serum Refractometry and Brix Refractometry for the Diagnosis of Inadequate Transfer of Passive Immunity in Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 1, p. 474–483, 2018.
- BURTON, J. L. *et al.* Variation in Serum Concentrations of Immunoglobulins G, A, and M in Canadian Holstein-Friesian Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 135–149, 1989.
- BUSH, L. J.; STALEY, T. E. Absorption of Colostral Immunoglobulins in Newborn Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 4, p. 672–680, 1980.
- CARVALHO, J. G. DE. **Produção de IgY anti-Cryptosporidium parvum e avaliação da resposta humoral de bezerros com criptosporidiose experimental**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.
- CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 87–104, 2008.
- CHIGERWE, M.; HAGEY, J. V.; ALY, S. S. Determination of neonatal serum immunoglobulin G concentrations associated with mortality during the first 4 months of life in dairy heifer calves. **Journal of Dairy Research**, v. 82, n. 4, p. 400–406, 2015.
- CONSTABLE, P. *et al.* **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats - two-volume set**. 11 ed. ed. [s.l.] Saunders Ltd., 2016.

- CORTESE, V. S. Neonatal Immunology. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 221–227, 2009.
- DANIELE, C. *et al.* Efeito de diferentes manejos de fornecimento prolongado de colostro sobre os níveis de proteína e albúmina séricas e desempenho de bezerras recém-nascidas. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 2, p. 381–388, 1994.
- DAVIS, C. L.; DRACKLEY, J. K. **The development, nutrition, and management of the young calf**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1998.
- DEELEN, S. M. *et al.* Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3838–3844, 2014.
- DENISE, S. K. *et al.* Effects of Passive Immunity on Subsequent Production in Dairy Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 2, p. 552–554, 1989.
- DONOVAN, G. A. *et al.* Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 34, n. 1, p. 31–46, 1998.
- DRIKIC, M. *et al.* Determining the IgG concentrations in bovine colostrum and calf sera with a novel enzymatic assay. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2018.
- ELSOHABY, I. *et al.* A rapid field test for the measurement of bovine serum immunoglobulin G using attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, 2015.
- ELSOHABY, I. *et al.* Quantification of bovine immunoglobulin G using transmission and attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 1, p. 30–37, 2016.
- ELSOHABY, I. *et al.* Using serum and plasma samples to assess failure of transfer of passive immunity in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, 2019.
- ELSOHABY, I.; KEEFE, G. P. Preliminary validation of a calf-side test for diagnosis of failure of transfer of passive immunity in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4754–4761, 2015.
- ELSOHABY, I.; MCCLURE, J. T.; KEEFE, G. P. Evaluation of Digital and Optical Refractometers for Assessing Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 721–726, 2015.
- FEINBERG, G. Single Radial Immunodiffusion. In: **Encyclopedia of Immunology**. [s.l.: s.n.]. p. 1287–1289.
- FEITOSA, F. L. F. *et al.* Diagnóstico De Falha De Transferência De Imunidade Passiva Em Bezerros Através Da Determinação De Proteína Total E De Suas Frações Eletroforéticas, Imunoglobulinas G E M E Da Atividade Da Gama Glutamil Transferase No Soro Sangüíneo. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 251–255, 2001.
- FURMAN-FRATCZAK, K.; RZASA, A.; STEFANIAK, T. The influence of colostrum immunoglobulin concentration in heifer calves' serum on their health and growth. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5536–5543, 2011.
- GELSINGER, S. L. *et al.* 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. 4084–4089, 2015.
- GODDEN, S. Colostrum Management for Dairy Calves. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 19–39, 2008.
- HOGAN, I. *et al.* Comparison of rapid laboratory tests for failure of passive transfer in the bovine. **Irish Veterinary Journal**, v. 68, n. 1, 2015.
- KANECO, J. J.; HARVEY, J. W. ; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. [s.l.] Academic Press, 2008.
- LORA, I. *et al.* Association between passive immunity and health status of dairy calves under 30 days

of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 152, n. January, p. 12–15, 2018.

LORA, I. *et al.* Transfer of passive immunity in dairy calves: The effectiveness of providing a supplementary colostrum meal in addition to nursing from the dam. **Animal**, v. 13, n. 11, p. 2621–2629, 2019.

MACHADO-NETO, R.; PACKER, I. U.; SUSIN, I. Proteína total sérica em bezerros da raça holandesa submetidos a diferentes regimes de aleitamento. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v. 43, p. 265–284, 1986.

MCGUIRK, S. M.; COLLINS, M. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 3 SPEC. ISS., p. 593–603, 2004.

MORAES, M. P. *et al.* Relationship between passive immunity and morbidity and weight gain in dairy cattle. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 299–304, 2000.

MORRILL, K. M. *et al.* Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3997–4005, 2012.

MORRILL, K. M. *et al.* Estimate of serum immunoglobulin G concentration using refractometry with or without caprylic acid fractionation. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4535–4541, 2013.

O’NEILL, J. Book review: Tackling drug-resistant infections globally. **Archives of Pharmacy Practice**, v. 7, n. 3, p. 110, 2016.

PAULETTI, P. *et al.* Quality of colostrum passive immunity and pattern of serum protein fluctuation in newborn calves. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 3, p. 453–456, 2003.

PENHALE, W. J. *et al.* Quantitative studies on bovine immunoglobulins. II. Plasma immunoglobulin levels in market calves and their relationship to neonatal infection. **The British veterinary journal**, v. 126, n. 1, p. 30–32, 1970.

PETER, A. T. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 693–705, 2013.

PFEIFFER, N. E. *et al.* Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 693–698, 1977.

PFEIFFER, N. E.; MCGUIRE, T. C. Sodium sulfite precipitation test for assessment of colostrum immunoglobulin transfer to calves.pdf. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 8, p. 809–811, 1977.

QUIGLEY, J. **Calf Note # 39 – Using a refractometer**. Disponível em: <<http://calfnotes.com/pdffiles/CN039.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2018.

QUIGLEY, J. **Calf Note 187 - BRIX Refractometer for serum IgG**. Disponível em: <<https://www.calfnotes.com/pdffiles/CN187.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2018.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.

RABOISSON, D.; TRILLAT, P.; CAHUZAC, C. Failure of passive immune transfer in calves: A meta-analysis on the consequences and assessment of the economic impact. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016.

RENAUD, D. L. *et al.* Short communication: Validation of methods for practically evaluating failed passive transfer of immunity in calves arriving at a veal facility. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9516–9520, 2018.

ROSENBERGER. **Exame clínico dos bovinos**. 3. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 1993.

SACCO, R. E. *et al.* Neonatal calf infection with respiratory syncytial virus: Drawing parallels to the disease in human infants. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3731–3753, 2012.

- SANTOS, R. B.; SILVA, J. M.; BELETTI, M. E. Ultrastructure of bovine placenta during all gestational period. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1376–1384, 2017.
- SHIVLEY, C. B. *et al.* Preweaned heifer management on US dairy operations: Part II. Factors associated with colostrum quality and passive transfer status of dairy heifer calves. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9185–9198, 2018.
- TEIXEIRA, W. T. *et al.* Transfer of passive immunity and serum proteinogram in the first six months of life of Criollo lageano and black and white holstein calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 980–986, 2012.
- TODD, C. G. *et al.* An observational study on passive immunity in Irish suckler beef and dairy calves: Tests for failure of passive transfer of immunity and associations with health and performance. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 159, p. 182–195, 2018.
- TÓTHOVÁ, C. *et al.* Changes in the concentrations of serum proteins in calves during the first month of life. **Journal of Applied Animal Research**, v. 44, n. 1, p. 338–346, 2016.
- TYLER, J. W. *et al.* Evaluation of 3 Assays for Failure of Passive Transfer in Calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)**, v. 10, n. 5, p. 304–307, 1996.
- TYLER, J. W. *et al.* Use of serum protein concentration to predict mortality in mixed-source dairy replacement heifers. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 12, n. 2, p. 79–83, 1998.
- TYLER, J. W. *et al.* Detection of low serum immunoglobulin concentrations in clinically ill calves. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 1, p. 40–43, 1999.
- WEAVER, D. M. *et al.* Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 6, p. 569–577, 2000.
- WINDEYER, M. C. *et al.* Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 2, p. 231–240, 2014.

5. CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS

5.1. Resumo

O tipo de placenta da vaca (sinepiteliocorial cotiledonar) é constituído de várias camadas entre a circulação fetal e a circulação materna, comprometendo a passagem de imunoglobulinas pela placenta, tornando o bezerro completamente dependente da ingestão do colostro para adquirir imunidade passiva. Existem diversas técnicas para avaliar a transferência de imunidade passiva (TIP) laboratorialmente e a campo. O presente estudo propõe um novo método para avaliação a campo da TIP baseado na modificação da técnica de turvação do sulfito de sódio. Para a realização do estudo, avaliou-se 168 amostras de soro de bezerros de 24 a 48 horas de idade, testando-se 17 concentrações de sulfito de sódio (de 12% a 20%), em triplicata. A concentração do sulfito de sódio que se mostrou mais adequada para uso no teste rápido foi a concentração de 15%. O custo estimado com insumos para a produção do teste rápido com sulfito de sódio na concentração de 15% foi estimado em R\$0,45.

Palavras-chave: monitoramento; bezerro neonato; medicina da produção.

5.2. Introdução

O sistema imune do bezerro na fase fetal já é ativo desde a concepção, porém é imaturo até 6 meses de vida (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Como o tipo de placenta da vaca (sinepiteliocorial cotiledonar) é constituído de várias camadas entre a circulação fetal e a circulação materna (SANTOS; SILVA; BELETTI, 2017), a passagem de anticorpos maternos ao feto fica comprometida (WEAVER *et al.*, 2000). Desse modo, os bezerros nascem hipogamaglobulinêmicos e são dependentes da ingestão do colostro – primeiro leite ordenhado após o parto - para adquirir imunoglobulinas (especialmente imunoglobulina G1 - IgG1) suficientes para apresentar resposta imune satisfatória diante dos agentes patogênicos aos quais estarão expostos no início da vida (GODDEN, 2008; PENHALE *et al.*, 1970).

Em um estudo francês se observou que a Falha na Transferência de Imunidade Passiva (FTIP) acarreta em um custo total de €60 (€10–109) e €80 (€20–139) por animal acometido para os sistemas produtivos de leite e corte, respectivamente, e

estão associados ao aumento da mortalidade, da morbidade e de redução no ganho de peso dos animais (FURMAN-FRATCZAK; RZASA; STEFANIAK, 2011; WINDEYER *et al.*, 2014; RABOISSON; TRILLAT; CAHUZAC, 2016). Além disso, a FTIP está associada à redução da eficiência produtiva e impactos na vida adulta (DENISE *et al.*, 1989).

Considera-se que houve FTIP quando a concentração de IgG é menor que 1,0 g/dL em bezerros de 1 a 7 dias de idade (WEAVER *et al.*, 2000; MCGUIRK; COLLINS, 2004). Laboratorialmente, a imunoglobulina é dosada de forma direta pela técnica de imunodifusão radial, que é considerada o padrão-ouro para a avaliação da TIP em bezerros (PENHALE *et al.*, 1970; FLEENOR; STOTT, 1981). Contudo, essa técnica é cara, demorada e depende de elevado conhecimento técnico para sua realização (GODDEN, 2008; ELSOHABY *et al.*, 2016). Outras técnicas laboratoriais disponíveis para avaliação da TIP são: análise bioquímica da proteína total e frações, análise bioquímica da Gama Glutamiltransferase (GGT), teste de turvação do sulfato de zinco e teste de turvação do sulfato de sódio (MCEWAN *et al.*, 1970; PFEIFFER *et al.*, 1977c; TYLER *et al.*, 1996; GÜNGÖR; BASTAN; ERBIL, 2004; LEE *et al.*, 2008). Todas estas técnicas permitem uma estimativa da concentração da imunoglobulina, sendo, portanto, métodos indiretos para avaliação de TIP (GODDEN, 2008).

A Transferência de Imunidade Passiva (TIP) pode ser quantificada nas fazendas para que seja avaliada a eficiência do manejo da colostragem, a fim de reduzir os prejuízos associados à esta condição. Atualmente, as fazendas utilizam a refratometria (óptica ou digital) para proteína ou BRIX como forma de monitoramento da TIP (GODDEN, 2008; ALVES; AZEVEDO; ROBSON, 2014; DEELEN *et al.*, 2014; BUCZINSKI *et al.*, 2018; ELSOHABY *et al.*, 2019a). A refratometria é uma metodologia indireta de avaliação da imunoglobulina, pois estima os sólidos da amostra pela refração da luz no prisma (QUIGLEY, 2016). No entanto, esta metodologia, embora bastante prática, está sujeita a diversos interferentes, como a temperatura da amostra, característica da mesma (lipemia e teor de glicose), calibração e manutenção do equipamento e qualidade do mesmo (QUIGLEY, 2001b).

Neste sentido, diversas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de desenvolver novas tecnologias para avaliar a TIP a campo (ALLEY; HAINES; SMITH, 2012; ELSOHABY *et al.*, 2015; ELSOHABY; KEEFE, 2015; DRIKIC *et al.*, 2018).

A técnica de turvação do sulfito de sódio foi desenvolvida por Howe (1921) e posteriormente modificada por diversos autores. A técnica consiste de distintas soluções que causam a precipitação seletiva de proteínas de alto peso molecular, incluindo imunoglobulinas, e que provoca a turvação das soluções (STONE; GITTER, 1969; PFEIFFER; MCGUIRE, 1977).

Para a realização do teste de turvação do sulfito de sódio são preparadas soluções de 14%, 16% e 18% de sulfito de sódio usando água destilada. Para cada amostra de soro, são preparados 3 tubos de ensaio de borossilicato de 13x100 mm contendo 1,9 mL de cada solução. Em seguida, adiciona-se 0,1 mL de soro a cada um dos 3 tubos. Os tubos são misturados e deixados a incubar durante 15 minutos à 23 °C. Para a leitura, observa-se a turvação dos tubos e os mesmos são classificados em escala de cruces: 0, 1+, 2+, 3+; onde 0 é equivalente à ausência de turbidez em todos os 3 tubos, 1+ é equivalente à turbidez observada na solução de sulfito de sódio à 18% apenas, 2+ é equivalente à turbidez observada nas soluções de 16% e 18% apenas, e 3+ equivalente à turbidez observada em todos os 3 tubos (TYLER *et al.*, 1996). Segundo Howard (1993), a interpretação do resultado é feita da seguinte forma:

- Turvação nos 3 tubos (3+): Concentração de imunoglobulinas G maior que 1500 mg/dL, indicando imunização adequada;
- Turvação nos tubos de 16 e 18% (2+): Concentração de imunoglobulinas G variando de 500 a 1500 mg/dL, indicando falha parcial na transferência de imunidade passiva;
- Turvação apenas no tubo de 18% (1+): Concentração de imunoglobulinas G menor que 500 mg/dL, indicando falha na transferência de imunidade passiva;
- Ausência de turvação nos 3 tubos: Falha na transferência de imunidade passiva.

Embora os estudos com a técnica de turvação do sulfito de sódio tenham reduzido após trabalho realizado por Tyler *et al.* (1996), no qual se observou baixa especificidade da técnica utilizando 1,0 g/dL de IgG como ponto de corte, um estudo realizado pelo nosso grupo sugeriu que a técnica poderia ser utilizada, mediante mais estudos (VESPASIANO *et al.*, 2013).

O presente trabalho propõe, então, um novo método para avaliação a campo da TIP baseado na modificação da técnica de turvação do sulfito de sódio. Além disso, compara a técnica desenvolvida com as técnicas de refratometria óptica de Proteína Total, refratometria digital de Proteína Total, refratometria digital de Brix, Proteína Total e frações em analisador bioquímico automático e IDR padronizada *in house*.

5.3. Objetivos

5.3.1. Objetivos gerais

Dentre os objetivos gerais do presente trabalho estão o desenvolvimento de uma nova tecnologia que possa ser utilizada a campo para a avaliação da transferência de imunidade passiva (TIP) em bezerros.

Desenvolveu-se um teste rápido baseado na modificação da técnica de turvação do sulfito de sódio, que determina de forma dicotômica e qualitativa a eficiência da TIP em bezerros. Para tanto, objetivou-se identificar uma concentração única da solução do sulfito de sódio a ser utilizada no referido teste.

Para determinar a concentração da solução do sulfito de sódio do teste rápido e comparar as técnicas de avaliação da TIP, padronizou-se a técnica de Imunodifusão Radial *in house* (Capítulo 2).

Por fim, comparou-se as técnicas de refratometria óptica de Proteína Total, refratometria digital de Proteína Total, refratometria digital de Brix, Proteína Total e frações em analisador bioquímico automático e IDR padronizada *in house* com a técnica desenvolvida da turvação do sulfito de sódio modificada.

5.3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Comparar os resultados qualitativos da turvação de 17 concentrações de soluções de sulfito de sódio com os testes de Imunodifusão Radial *in-house* (padrão-ouro), a fim de determinar a concentração de solução de sulfito de sódio que melhor indicasse a adequada TIP ao bezerro, ou seja, estabelecer a concentração de sulfito de sódio na qual a amostra de soro misturada à solução turvasse caso o bezerro, às 24 a 48 horas de idade,

apresentasse concentração sérica de IgG > 2,0 g/dL e não turvasse caso o mesmo apresente concentração sérica de IgG < 2,0 g/dL;

- Determinar a área abaixo da curva característica de operação do receptor (em inglês *Receiver Operating Characteristic*, ou curva ROC), índice Kappa, Acurácia, Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo da técnica desenvolvida. Além de realizar a validação cruzada;
- Comparar os resultados da técnica desenvolvida com os resultados de (1) refratômetro de Proteína Total óptico; (2) refratometria digital BRIX (3) Proteína Total e frações em analisador bioquímico automático e (4) Imunodifusão radial (padrão-ouro) *in house*;
- Por fim, objetivou-se estimar o custo com insumos para realização da técnica de sulfito de sódio modificada.

5.4. Material e métodos

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG pelo protocolo CEUA/UFMG nº 308/2019

5.4.1. Amostras

Foram utilizadas 168 amostras de soro (mínimo 4 mL) de bezerros de 24 a 48 horas de idade da soroteca do laboratório da Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV) da Escola de Veterinária da UFMG provenientes de diversas fazendas. As amostras chegavam ao laboratório congeladas (-20°C) e eram descongeladas a 37,5°C por 10 minutos para serem aliquotadas em microtubos tipo eppendorf (3 mL) e recongeladas até as análises de turvação do sulfito de sódio e demais análises do estudo.

Foram realizadas, com a mesma amostra, em triplicata, as: (1) análises da Proteína Total e Albumina Sérica no COBAS Mira Plus® (analisador bioquímico automático) e posterior cálculo das globulinas (por diferença); (2) refratometria óptica de Proteína Total com refratômetro portátil Mega Brix®, Modelo RHC-200AT (SC Metra S.R.L., Piata Cazarmii, Romênia); (3) análises de refratometria BRIX e Proteína Total digital

(Misco Palm Abbe digital refractometer PA203 ®); e (4) Imunodifusão Radial padronizada *in house*. Todas as análises foram realizadas por um único avaliador. Por questões de volume de amostra e/ou custo da técnica, nem todas as análises foram realizadas com todas as amostras. O número de valores válidos por técnica se encontra na descrição de cada técnica.

Com exceção da Padronização da Imunodifusão Radial, que foi realizada no Laboratório de Retrovíruses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, todas as análises foram realizadas no MULTILAB do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG.

5.4.2. Procedimentos

5.4.2.1. Teste de turvação do Sulfito de Sódio modificado

O teste de turvação do sulfito de sódio foi realizado na Unidade Multidisciplinar de Pesquisa Animal - MULTILAB do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV) da Escola de Veterinária da UFMG modificando a técnica descrita por Pfeiffer e Mcguire (1977). Foram preparadas soluções de 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% e 20% de sulfito de sódio (Sulfito de Sódio Anidro P.A./ACS Na₂SO₃; Neon Comercial) usando água destilada. Para cada amostra de soro, foram preparados 17 tubos de ensaio de vidro (13x100mm) contendo 950µL de cada solução. As amostras foram descongeladas por 10 minutos em banho-maria à 37,5°C. Em seguida, foi adicionado 50µL de amostra de soro a cada um dos 17 tubos. Os tubos foram misturados e deixados para incubar durante 15 minutos em temperatura ambiente (20 a 24°C). Para a leitura, foi observada a turvação ou não de cada solução, considerando-se como parâmetro para a turvação a possibilidade de leitura através do tubo (escrita com fonte Arial, tamanho 11). As análises foram realizadas em triplicata, totalizando 504 resultados, e o custo da técnica foi levantado com base nos insumos necessários para a realização da mesma.

5.4.2.2. Análises da Proteína Total e Albumina Sérica no analisador bioquímico automático

A Proteína Total e a Albumina Sérica foram dosadas, em triplicata, com leitura em analisador bioquímico Cobas Mira Plus ®(Roche Analytical Instruments) pelo método do Biureto (kit Biotécnica Proteína Total VET ®) e método do Verde de Bromocresol (kit Biotécnica Albumina Sérica VET ®), respectivamente. As análises foram realizadas seguindo as instruções das bulas, após calibração do equipamento. A partir dos resultados obtidos para Proteína Total e Albumina Sérica no analisador bioquímico automático, foram estimados os resultados das Globulinas de cada amostra, segundo a fórmula (1):

$$\text{Concentração das Globulinas (g/dL)} = \text{Concentração da Proteína Total (g/dL)} - \text{Concentração da Albumina Sérica (g/dL)}$$

5.4.2.3. Refratometria óptica de Proteína Total

Utilizou-se o refratômetro óptico para Proteína Total Mega Brix ®, Modelo RHC-200AT (SC Metra S.R.L., Piata Cazarmii, Romênia). No início de cada dia de análise, o equipamento era calibrado com água destilada e, em seguida, eram depositados no prisma do refratômetro 100 µL de soro. O valor de Proteína Total do soro (g/dL) foi lido na linha entre as áreas claras e escuras que aparecem na escala do refratômetro óptico.

5.4.2.4. Refratometria digital BRIX e Proteína Total

Utilizou-se o refratômetro digital para BRIX e Proteína Total Misco Palm Abbe digital refractometer PA203 ®. No início de cada dia de análise, o equipamento era calibrado com água destilada e, em seguida, eram depositados no prisma do refratômetro 50 µl de soro. O valor de porcentagem BRIX e Proteína Total do soro (g/dL) foram obtidos pela leitura digital.

5.4.2.5. Imunodifusão Radial padronizada in house

A descrição completa da padronização da IDR pode ser lida no Capítulo 2. Em resumo, preparou-se 6 mL do gel de ágar Noble a 1,25% em tampão borato (pH 8,6) ao qual foi adicionado 3.250 µg/mL de anti-IgG bovino purificado de coelho. A mistura

foi transferida para uma placa de Petri de vidro de 90 x 18 mm que se encontrava em plataforma nivelada. Após completa polimerização do gel, o mesmo era perfurado. Para obtenção do controle e da curva-padrão, adicionou-se 5µL do IgG bovino purificado de concentração conhecida (14,1 µg/mL) puro no primeiro poço, diluído 1:2 no segundo poço, diluído 1:4 no terceiro poço e diluído 1:8 no quarto poço (limpando o exterior da ponteira). As amostras de soro de bezerros foram diluídas 1:4 com PBS 1 X. Adicionou-se 5µL de cada amostra diluída nos demais poços (limpando o exterior da ponteira). As placas foram incubadas por 36 horas em câmara úmida na estufa a 34°C. Os diâmetros dos halos de precipitação dos 4 controles (IgG bovino puro, diluído 1:2, 1:4 e 1:8), bem como das amostras, foram medidos utilizando um paquímetro (Digimess Stainless Hardned®). Caso a amostra não formasse halo, a mesma era repetida sem diluição. Caso o imunoprecipitado expandisse de modo a não formar halo, a amostra era repetida com diluição 1:6. No Microsoft Office Excel®, a curva-padrão foi produzida correlacionando os resultados dos diâmetros dos controles às respectivas concentrações de IgG bovino (Anexo 2 – Protocolo IDR, Formulário e Planilha para conversão dos resultados da IDR). Baseado na fórmula de regressão linear obtida pela curva-padrão, foram calculadas as concentrações de IgG bovina das amostras de soro dos bezerros.

5.4.3. Dados de mortalidade

Os veterinários das fazendas cujas amostras foram incluídas nos estudos enviaram os resultados de mortalidade até os 90 dias de idade dos bezerros amostrados. Os dados foram fornecidos com a anuência dos proprietários dos animais.

5.4.4. Análise estatística

Foram ajustados modelos de regressão logística para os dados de turvação em solução de sulfito de sódio em relação aos valores do teste de Imunodifusão Radial. Um modelo foi ajustado para cada concentração de sulfito de sódio. A qualidade dos modelos foi quantificada através das seguintes estatísticas: área abaixo da curva característica de operação do receptor (em inglês *Receiver Operating Characteristic*, ou curva ROC), índice Kappa, Acurácia, Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo (Altman & Bland, 1994a; 1994b). Como esses modelos visam a predição de novos casos, aplicou-se também a técnica da validação

cruzada para o cálculo dessas estatísticas (Heller *et al.*, 2009). Para isso, o banco de dados foi dividido igualmente em quatro partes. Três partes foram utilizadas para ajuste do modelo e a quarta parte foi utilizada para testar a qualidade da predição pelo cálculo das estatísticas descritas anteriormente. O procedimento foi repetido para cada uma das quatro partes e calculou-se a média dos resultados das estatísticas de qualidade do ajuste. O melhor modelo escolhido foi aquele com o maior valor médio das estatísticas avaliadas. Após a seleção do melhor modelo, foram avaliados se as características da amostra (*i.e.*, hemólise, icterícia e lipemia) poderiam afetar o resultado da turvação. Diferenças entre grupos foram avaliadas através de técnicas não paramétricas (teste de Mann-Whitney para comparação de dois grupos e Kruskal-Wallis para comparações de três ou mais grupos). Por último, estimou-se a média e o intervalo de 95% de confiança para a predição do valor do teste de Imunodifusão Radial para soluções turvas e não turvas.

A associações entre a turvação da solução de sulfito de sódio a 15% e 13% (valores selecionados na primeira análise estatística) com limites pré-determinados de variáveis bioquímicas foi avaliada a partir da construção de tabelas de contingência e do cálculo do índice Kappa de concordância, da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia balanceada.

A associações entre a turvação da solução de sulfito de sódio a 15% e 13% (valores selecionados na primeira análise estatística) com a mortalidade dos bezerras foi avaliada a partir da construção de tabelas de contingência e do cálculo do índice Kappa de concordância, da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia balanceada.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

5.5. Resultados

A tabela abaixo (Tabela 1) apresenta as estatísticas da qualidade do ajuste para cada uma as concentrações de sulfito de sódio testadas (12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% e 20%).

Tabela 1. Estatísticas da qualidade do ajuste para as concentrações de sulfito de sódio testadas (12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% e 20%).

Concentração	Ponto de corte	Área abaixo da curva ROC	Acurácia	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo Negativo	Acurácia balanceada	Validação Cruzada					Média
									Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo Negativo	Acurácia balanceada	
12%	NA [NA ; 6,13]	82%	94%	0%	100%	NA	94%	50%	0%	100%	NA	94%	50%	66%
12.5%	6,43 [NA ; 5,65]	79%	90%	2%	100%	50%	91%	51%	0%	100%	0%	90%	50%	59%
13%	4,92 [5,43 ; 4,55]	83%	84%	22%	97%	58%	86%	59%	23%	97%	60%	86%	60%	68%
13.5%	3,6 [3,83 ; 3,4]	90%	82%	67%	89%	71%	87%	78%	67%	89%	71%	87%	78%	80%
14%	3,12 [3,29 ; 2,95]	92%	86%	81%	89%	81%	89%	85%	81%	89%	81%	89%	85%	86%
14.5%	2,44 [2,59 ; 2,3]	95%	89%	87%	91%	90%	88%	89%	87%	91%	90%	89%	89%	89%
15%	2,12 [2,26 ; 1,98]	95%	90%	89%	92%	93%	88%	90%	89%	91%	92%	88%	90%	91%
15.5%	1,91 [2,06 ; 1,77]	94%	88%	88%	89%	91%	85%	88%	88%	88%	91%	84%	88%	89%
16%	1,63 [1,78 ; 1,49]	92%	86%	87%	83%	90%	79%	85%	86%	83%	90%	77%	84%	85%
16.5%	1,45 [1,59 ; 1,3]	92%	86%	88%	82%	91%	77%	85%	88%	82%	91%	77%	85%	85%
17%	1,24 [1,38 ; 1,09]	91%	85%	89%	74%	90%	72%	81%	89%	74%	90%	72%	81%	82%
17.5%	1,18 [1,32 ; 1,03]	92%	86%	91%	73%	90%	74%	82%	90%	73%	90%	73%	82%	83%
18%	1,13 [1,27 ; 0,98]	92%	86%	91%	70%	90%	74%	81%	92%	70%	90%	75%	81%	82%
18.5%	1,06 [1,19 ; 0,93]	93%	87%	93%	67%	90%	75%	80%	92%	67%	90%	74%	80%	82%
19%	0,94 [1,08 ; 0,79]	91%	86%	93%	60%	89%	72%	77%	93%	61%	89%	72%	77%	80%
19.5%	0,84 [0,98 ; 0,67]	91%	86%	94%	56%	89%	70%	75%	94%	55%	89%	70%	75%	79%
20%	0,8 [0,93 ; 0,64]	92%	87%	94%	56%	90%	70%	75%	95%	57%	90%	74%	76%	80%

As figuras abaixo (Figura 1 a 17) apresentam as curvas ajustadas para cada concentrações de sulfito de sódio testadas (12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% e 20%, respectivamente). Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

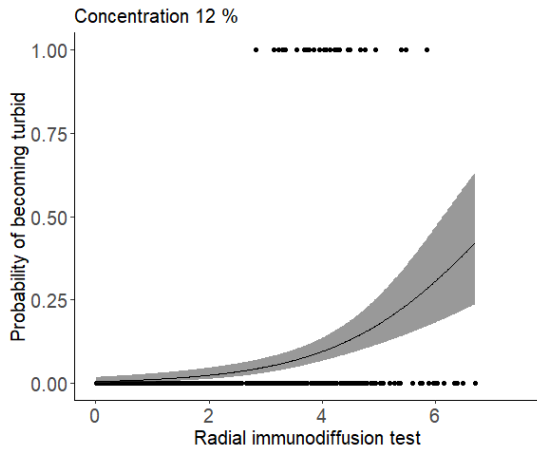


Figura 1. Curva ajustada da concentração de 12% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

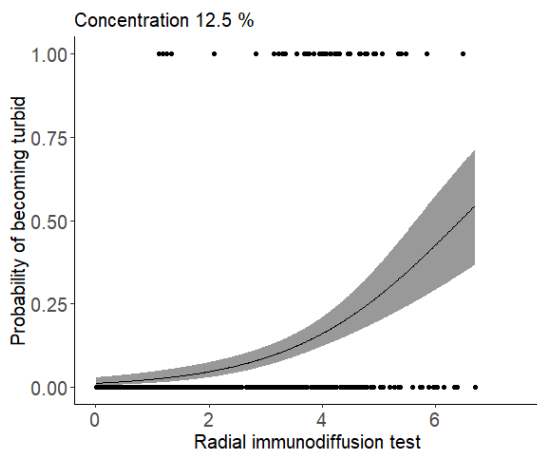


Figura 2. Curva ajustada da concentração de 12,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

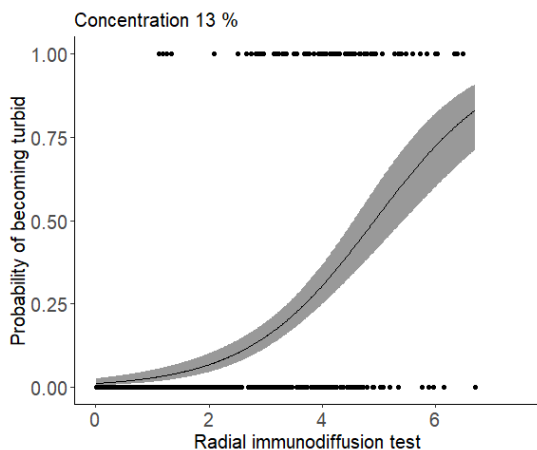


Figura 3. Curva ajustada da concentração de 13% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

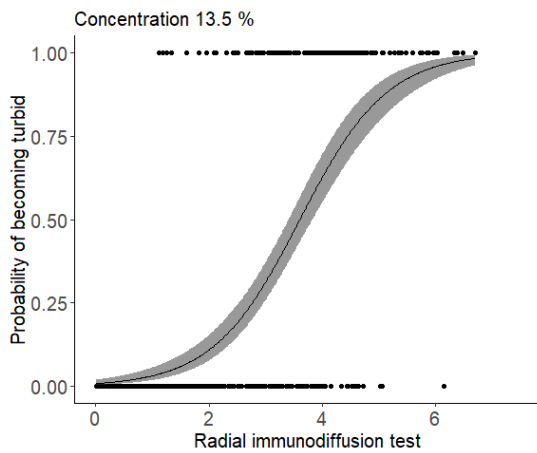


Figura 4. Curva ajustada da concentração de 13,15% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

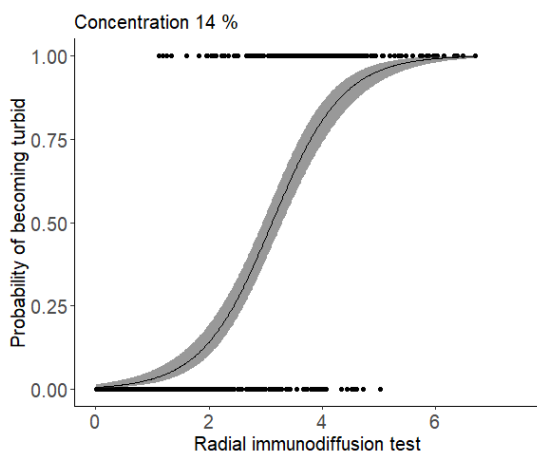


Figura 5. Curva ajustada da concentração de 14% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

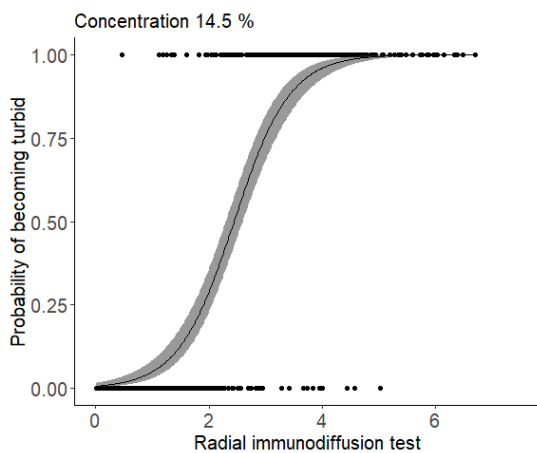


Figura 6. Curva ajustada da concentração de 14,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

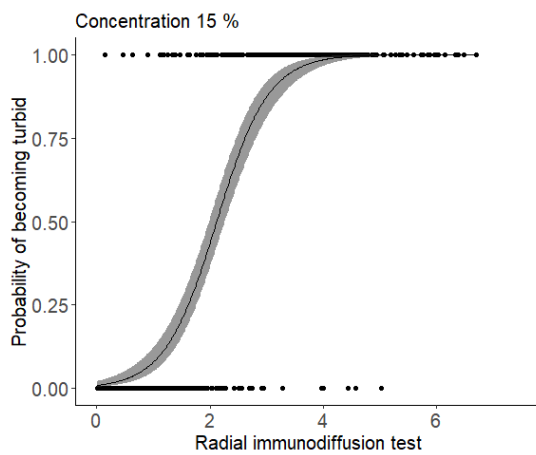


Figura 7. Curva ajustada da concentração de 15% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

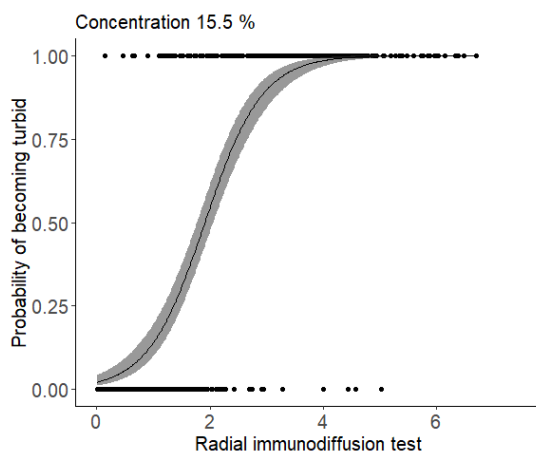


Figura 8. Curva ajustada da concentração de 15,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

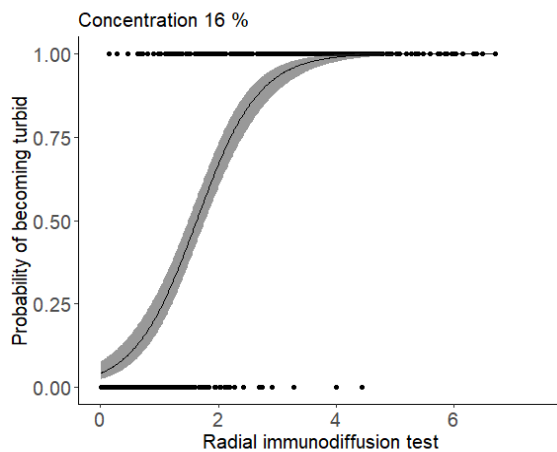


Figura 9. Curva ajustada da concentração de 16% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

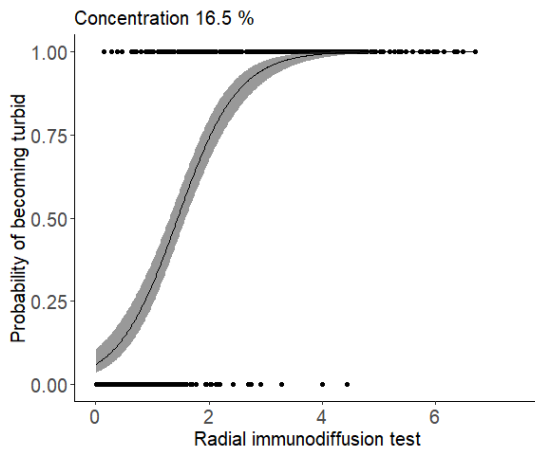


Figura 10. Curva ajustada da concentração de 16,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

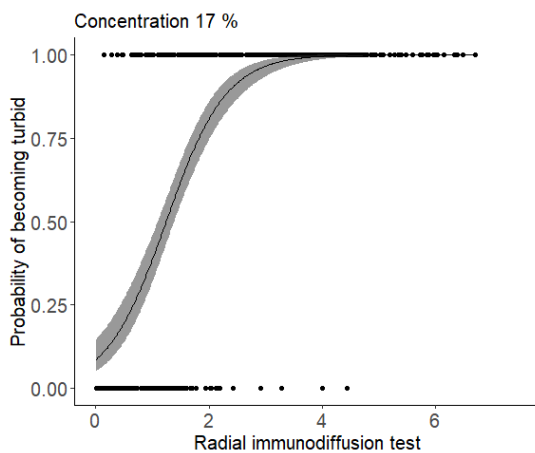


Figura 11. Curva ajustada da concentração de 17% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

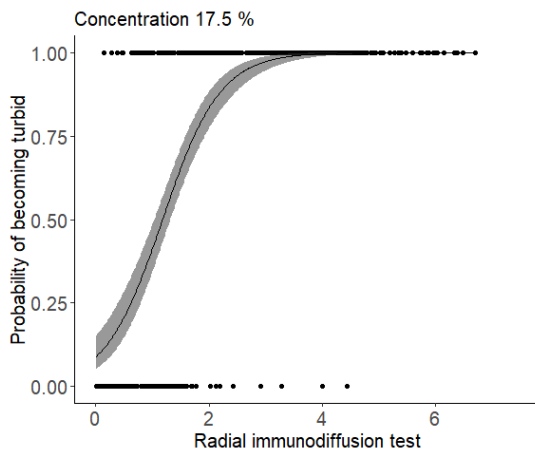


Figura 12. Curva ajustada da concentração de 17,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

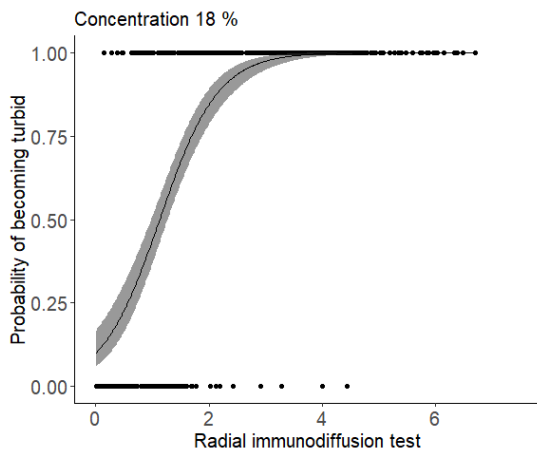


Figura 13. Curva ajustada da concentração de 18% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

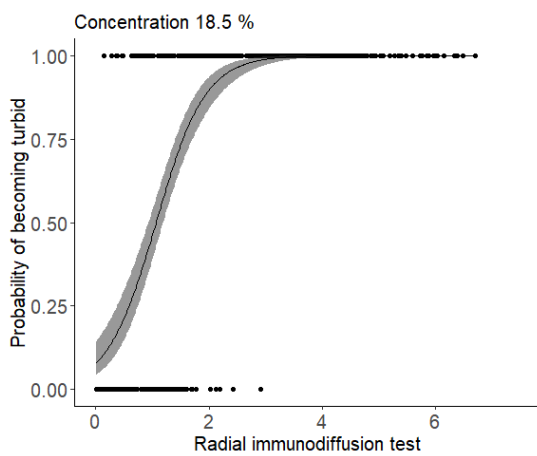


Figura 14. Curva ajustada da concentração de 18,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

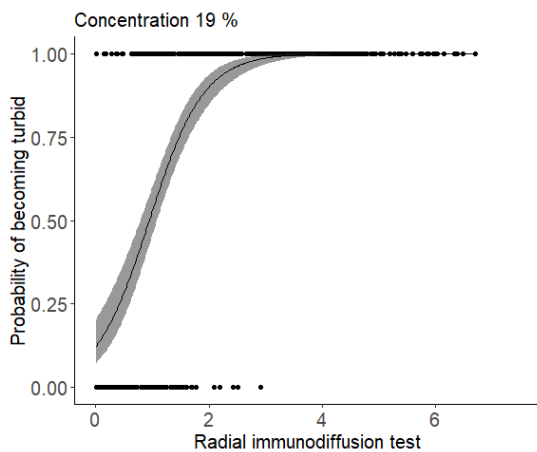


Figura 15. Curva ajustada da concentração de 19% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

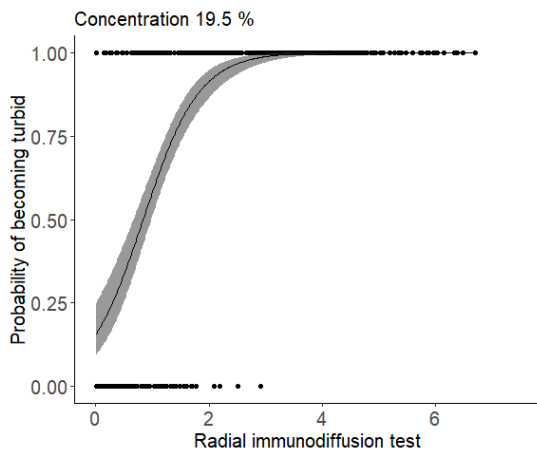


Figura 16. Curva ajustada da concentração de 19,5% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

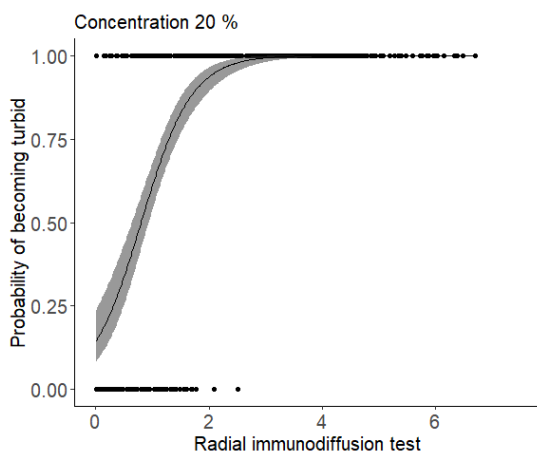


Figura 17. Curva ajustada da concentração de 20% de sulfito de sódio considerando a probabilidade de turvar em comparação ao resultado da concentração da imunoglobulina G na Imunodifusão Radial. Os pontos representam os testes realizados. Pontos na altura do valor 1 são soluções que turvaram e pontos na altura do valor zero são soluções que não turvaram.

As Figuras 18 e 19 mostram as comparações das médias dos valores da concentração da imunoglobulina na Imunodifusão Radial entre amostras que turvaram e amostras que não turvaram com a solução de sulfito de sódio à 15% e 13%, respectivamente.

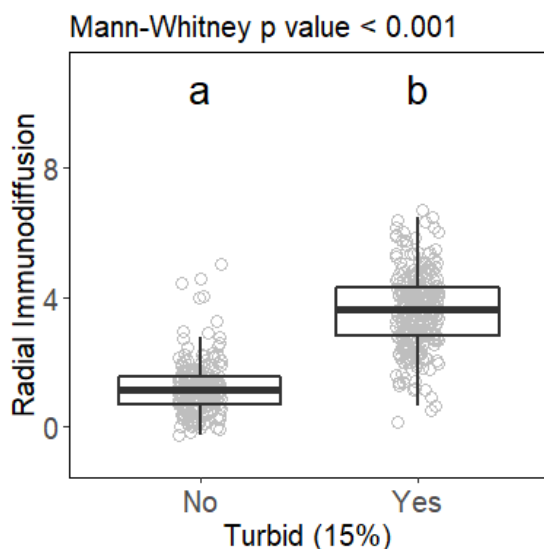


Figura 18. Comparação das médias dos valores da concentração da imunoglobulina na Imunodifusão Radial entre amostras que turvaram e amostras que não turvaram com a solução de sulfito de sódio à 15%.

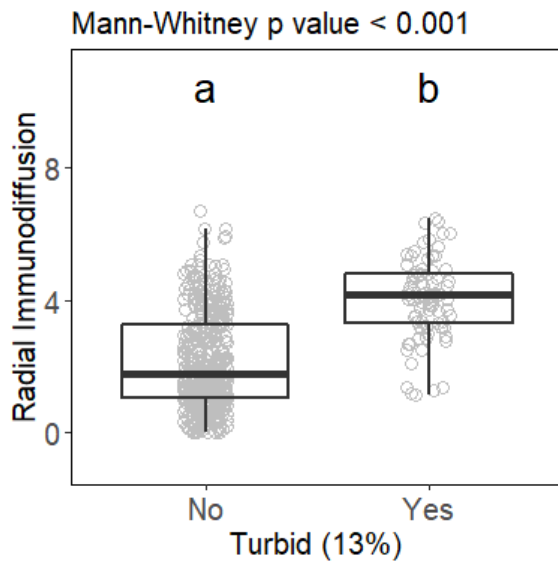


Figura 19. Comparação das médias dos valores da concentração da imunoglobulina na Imunodifusão Radial entre amostras que turvaram e amostras que não turvaram com a solução de sulfato de sódio à 13%.

As Tabelas 2 e 3 apresentam as características dos testes diagnósticos de solução de sulfato de sódio à 15% e 13% respectivamente, para avaliação da Transferência de Imunidade Passiva comparado aos testes de Imunodifusão Radial (IDR), Refratômetro digital Brix, Refratômetro óptico de Proteína Total, Proteína Total e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA) e seus respectivos pontos de corte equivalentes à 1,0 g/dL de imunoglobulina G na Tabela 2 (TYLER *et al.*, 1996; ELSOHABY; MCCLURE; KEEFE, 2015; HOGAN *et al.*, 2016) e 2,0 g/dL de imunoglobulina G na Tabela 3 (Capítulo 3). Para o cálculo da sensibilidade, considerou-se a porcentagem de amostra que turvaram no teste e foram superiores aos limites das demais técnicas. Já para o cálculo da especificidade, considerou-se a porcentagem de amostra que não turvaram no teste e foram inferiores aos limites das demais técnicas. Para o cálculo do Valor Preditivo Positivo, considerou-se a porcentagem de amostra que turvaram no teste sobre a totalidade de amostras que foram superiores aos limites das demais técnicas e para o cálculo do Valor Preditivo Negativo, considerou-se a porcentagem de amostras que não turvaram no teste sobre a totalidade de amostras que foram inferiores aos limites das demais técnicas.

Tabela 2. Características do teste diagnóstico de solução de sulfito de sódio à 15% para avaliação da Transferência de Imunidade Passiva comparado aos testes de Imunodifusão Radial (IDR), Refratômetro digital Brix, Refratômetro óptico de Proteína Total, Proteína Total e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA) e seus respectivos pontos de corte (valores entre parênteses).

Estatísticas para Sulfito de Sódio à 15%	IDR (corrigido para 1,0 g/dL de IgG*)	Refratômetro digital Brix (8,3%)	Refratômetro óptico de Proteína Total (5,5 g/dL)	Proteína Total em ABA (5,5 g/dL)	Globulinas em ABA (2,0 g/dL)
Kappa	81%	37%	60%	83%	49%
Sensibilidade	92%	96%	97%	94%	97%
Especificidade	89%	39%	61%	89%	50%
Valor preditivo positivo	91%	63%	74%	90%	69%
Valor preditivo Negativo	90%	91%	95%	93%	94%
Acurácia balanceada	91%	68%	79%	92%	74%
Média	89%	66%	78%	90%	72%

*Como a IDR padronizada *in house* não apresentou pureza total para IgG, estimou-se a IgG com base na literatura (BORGES *et al.*, 2001; BURTON *et al.*, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 2012; TÓTHOVÁ *et al.*, 2016).

Tabela 3. Características do teste diagnóstico de solução de sulfito de sódio à 13% para avaliação da Transferência de Imunidade Passiva comparado aos testes de Imunodifusão Radial (IDR), Refratômetro digital Brix, Refratômetro óptico de Proteína Total, Proteína Total e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA) e seus respectivos pontos de corte (valores entre parênteses).

Estatísticas para Sulfito de Sódio à 13%	IDR (corrigido para 2,0 g/dL de IgG*)	Refratômetro digital Brix (11%)	Refratômetro óptico de Proteína Total (7,6 g/dL)	Proteína Total em ABA (7 g/dL)	Globulinas em ABA (4,7 g/dL)
Kappa	39%	41%	37%	39%	57%
Sensibilidade	57%	57%	52%	55%	53%
Especificidade	87%	87%	87%	87%	92%
Valor preditivo positivo	46%	48%	44%	46%	58%
Valor preditivo Negativo	91%	91%	90%	91%	91%
Acurácia balanceada	72%	72%	70%	71%	73%
Média	65%	66%	63%	65%	69%

*Como a IDR padronizada *in house* não apresentou pureza total para IgG, estimou-se a IgG com base na literatura (BORGES *et al.*, 2001; BURTON *et al.*, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 2012; TÓTHOVÁ *et al.*, 2016).

A Tabela 4 apresenta as características dos testes diagnósticos de solução de sulfito de sódio à 15% e 13% respectivamente, para avaliação da Transferência de Imunidade Passiva comparado aos dados de mortalidade.

Tabela 4. Características dos testes diagnósticos de solução de sulfito de sódio à 13% e 15% para avaliação da Transferência de Imunidade Passiva comparado aos dados de mortalidade.

Estatísticas para mortalidade	Solução de sulfito de sódio à 13%	Solução de sulfito de sódio à 15%
Kappa	3%	12%
Sensibilidade	18%	57%
Especificidade	89%	63%
Valor preditivo positivo	89%	89%
Valor preditivo Negativo	18%	23%
Acurácia balanceada	54%	60%
Média	45%	50%

5.6. Discussão

Embora a Imunodifusão Radial (IDR) tenha sido realizada conforme instruções de Feinberg (1998), a pureza obtida para os inóculos e anti-Imunoglobulina G bovina (substratos para o teste) aparentemente não foram suficientes para determinar exclusivamente a imunoglobulina G (IgG). Diante disso, para melhor compreensão dos resultados do presente trabalho e comparação com outros, considerou-se, para alguns resultados, uma estimativa da IgG a partir do resultado da IDR padronizada *in house*. Com base nos valores de referência apresentados na literatura (BORGES *et al.*, 2001; BURTON *et al.*, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 2012; TÓTHOVÁ *et al.*, 2016), estimou-se que o valor de IgG real da amostra seja 50% do resultado da IDR padronizada.

Os resultados da Tabela 1 mostram que a concentração de sulfito de sódio com a maior média das estatísticas e, portanto, mais adequada para uso no teste rápido para avaliação da Transferência de Imunidade Passiva em bezerros de 24 a 48 horas de idade foi a concentração de 15%. Os resultados dos testes da concentração de sulfito de sódio à 15% apresentaram área abaixo da curva ROC de 95%, acurácia de 90% sensibilidade de 89%, especificidade de 92%, valor preditivo positivo de 93% e valor preditivo negativo de 88% considerando o ponto de corte de imunoglobulina G na IDR de 2,12 g/dL (com intervalo de confiança entre 2,26 e 1,98). No entanto, após correção

do valor da IDR, o ponto de corte real de imunoglobulina G na IDR passa a ser de 1,06 g/dL (com intervalo de confiança entre 1,13 e 0,99). Na validação cruzada, os valores obtidos na primeira análise se confirmaram. Resultado similar foi observado por Lee *et al.* (2008) ao avaliar amostras de soro de bezerros de 0 a 10 dias de idade utilizando a técnica de turvação do sulfito de sódio como descrito por Tyler *et al.* (1996). Utilizando 1,0 g/dL de IgG como ponto de corte para a FTIP, observou-se uma área abaixo da curva ROC de 88%, sensibilidade de 76% e especificidade de 99% nas amostras que apresentaram turvação apenas no tubo com solução de sulfito de sódio de 18% e ausência de turvação nos tubos com solução de sulfito de sódio de 16% e 14%.

Na Tabela 2 observa-se que a técnica de turvação do sulfito de sódio utilizando a concentração de 15% apresentou, comparada às técnicas de Imunodifusão Radial (IDR), Refratômetro digital Brix, Refratômetro óptico de Proteína Total, Proteína Total e Globulinas em Analisador Bioquímico Automático (ABA) e seus respectivos pontos de corte equivalentes à 1,0 g/dL de imunoglobulina G, elevada sensibilidade e valor preditivo negativo, já a especificidade e valor preditivo positivo tenderam a resultados menores. A Figura 18 mostra a diferença entre as médias dos valores da concentração da imunoglobulina na Imunodifusão Radial entre amostras que turvaram e amostras que não turvaram com a solução de sulfito de sódio à 15%, evidenciando que a técnica foi boa para classificar os indivíduos com e sem FTIP. Os resultados obtidos sugerem que a concentração de 15% de sulfito de sódio é interessante para o uso prático, pensando-se no ponto de corte para Falha da Transferência da Imunidade Passiva (FTIP) de 1,0 g/dL de imunoglobulina G, que é o ponto de corte classicamente sugerido (TYLER *et al.*, 1996; WEAVER *et al.*, 2000; GODDEN, 2008).

Contudo, esse ponto de corte vem sendo questionado, principalmente porque foi determinado arbitrariamente com base em estudos que o precederam (TYLER *et al.*, 1996). Na época em que essa pesquisa foi realizada, acreditava-se que o fornecimento de 2l de colostro era suficiente para atender às demandas do bezerro neonato. Contudo, foram realizados estudos que determinaram que essa quantidade era insuficiente para atender a todas as demandas do bezerro e, atualmente, fornece-se o dobro de colostro (SELMAN; MCEWAN; FISHER, 1971; WEAVER *et al.*, 2000; GODDEN, 2008;). Outros aspectos do sistema de produção de leite e de carne bovinos também sofreram mudanças desde então e, nesse sentido, os desafios aos

animais de produção são cada vez mais crescentes devido ao adensamento e intensificação dos sistemas de produção. Alguns autores sugerem pontos de corte mais elevados, como 1,5 g/dL (DAVIS; DRACKLEY, 1998) ou de 2,0 g/dL à 2,5 g/dL (CHIGERWE; HAGEY; ALY, 2015), que são mais coerentes com os desafios impostos pelos sistemas de criação atuais. Os resultados apresentados no Capítulo 3 reiteram a necessidade do aumento no ponto de corte da FTIP para 2,0 g/dL de IgG, principalmente para sistemas de criação em clima tropical. Sendo assim, a concentração de sulfito de sódio à 13% passa a ser a opção mais adequada.

Os resultados da Tabela 1 mostram que a concentração de sulfito de sódio à 13% apresentou área abaixo da curva ROC de 83%, acurácia de 84%, sensibilidade de 22%, especificidade de 97%, valor preditivo positivo de 58% e valor preditivo negativo de 86% considerando o ponto de corte de imunoglobulina G na IDR de 4,92 g/dL (com intervalo de confiança entre 5,43 e 4,55). No entanto, após correção do valor da IDR, o ponto de corte real de imunoglobulina G na IDR passa a ser de 2,46 g/dL (com intervalo de confiança entre 2,72 e 2,28). Na validação cruzada, os valores obtidos na primeira análise se confirmaram. Os baixos valores de sensibilidade poderiam comprometer o teste de turvação de sulfito de sódio à 13% em seu uso a campo. Todavia, os resultados da Tabela 3 indicam que, ao utilizar o ponto de corte de imunoglobulina G na IDR de 2,0 g/dL a sensibilidade do teste passa a ser de 57%, tornando-o considerável para essa finalidade. Os baixos valores preditivos positivos apresentados na Tabela 3 não comprometem demasiadamente a técnica, uma vez que refletem a proporção de bezerros cujas amostras de soro turvaram no teste de sulfito de sódio com concentração à 13% dentre aqueles que apresentavam concentração de IgG superior à 2,0 g/dL (valor corrigido). Assim, uma proporção relativamente alta de amostra de animais com adequada TIP não turvaram no teste rápido. Na prática, esses animais falsamente diagnosticados como apresentando FTIP não seriam prejudicados, uma vez que apenas passariam por manejos que reforçariam sua imunidade (por exemplo, à eles seria fornecido leite de transição, seria dada maior atenção às condições ambientais para esse animal, poderiam ser vacinados antes do período determinado pelo calendário vacinal). Desse modo, a despeito dessas possíveis falhas de classificação no diagnóstico da FTIP (Figura 19), a concentração de sulfito de sódio à 13% apresentou-se como a concentração mais

adequada para o desenvolvimento de um teste rápido para uso a campo nas condições de criação em clima tropical.

A associações entre a turvação da solução de sulfito de sódio a 13% e 15% com a mortalidade dos bezerros apresentadas na Tabela 4 foram ruins, pois a proporção de bezerros que vieram à óbito até os 90 dias de idade foi baixa (17%). Contudo, observa-se, nesse sentido, que as duas técnicas apresentaram elevado valor preditivo positivo, que determina a proporção de bezerros cujas amostras não turvaram dentre a totalidade de mortos (VPP de 89% para ambas técnicas). Os baixos valores de sensibilidade denotam a condição multifatorial da mortalidade, pois nem todos animais que morreram apresentavam amostras turvas (ou seja, FTIP), indicando que outros fatores estão relacionados à morte dos animais além da TIP.

Pretende-se que o teste rápido desenvolvido seja uma opção viável economicamente especialmente à sistemas de produção que não praticam nenhuma forma de monitoramento da TIP dos bezerros. O uso de técnicas de diagnóstico simples podem estimular os produtores e funcionários das fazendas à aderir às práticas de monitoramento, favorecendo que essas virem rotina e, conseqüentemente, aumentando as chances de melhoria nos resultados de produtividade da fazenda. Além disso, podem ser a porta de entrada para tecnologias mais complexas, diante da observação de resultados positivos. Segundo Beam *et al.* (2009) a FTIP é mais prevalente em fazendas que não monitoram rotineiramente a transmissão da imunidade passiva, apresentando 13,8 vezes mais chances de ter bezerros com FTIP que fazendas que realizam este monitoramento. Considerando que a FTIP está associada à prejuízos diretos e indiretos aos sistemas de criação de bezerros (RABOISSON; TRILLAT; CAHUZAC, 2016), estimular o seu monitoramento torna-se imprescindível para melhorar os índices produtivos e econômicos das propriedades.

As peças da patente, a saber: Resumo, Descrição, Figuras e Reinvidicações se encontram em anexo ao final do trabalho (anexo 3 a 6).

5.6.1. Custo da técnica

O custo estimado com insumos para a produção do teste rápido com sulfito de sódio na concentração de 13% e 15% foi estimado em R\$0,45 (Tabela 5). O baixo valor para a produção do teste rápido também foi observado por Lee *et al.* (2008) que estimaram

um custo por teste de U\$ 0,57 utilizando a técnica de turvação do sulfito de sódio como recomendada na literatura.

Tabela 5. Avaliação dos custos com insumo para a produção de uma unidade do teste rápido para diagnóstico da transferência de imunidade passiva em bezerros

Insumos	Quantidade	Unidade	Custo	Quantidade gasta em um teste	Rendimento em testes	Custo por unidade do teste
Sulfito de Sódio Anidro P.A.	1000	g	R\$ 38,40	0,25	4049	R\$ 0,01
Água destilada	5000	mL	R\$ 19,00	1,90	2632	R\$ 0,01
Recipiente com tampa	200	und	R\$ 85,00	1	200	R\$ 0,43
Custo final com insumos						R\$ 0,45

5.7. Conclusão

A concentração do sulfito de sódio que se mostrou mais adequada para uso no teste rápido para avaliação da Transferência de Imunidade Passiva em bezerros de 24 a 48 horas de idade foi a de 15%. A técnica desenvolvida é influenciada por graus moderado e intenso de hemólise e/ou icterícia, sendo contraindicado o uso de amostras de soro de bezerro com tais características. O custo estimado com insumos para a produção de uma unidade do teste rápido com sulfito de sódio na concentração de 15% foi estimado em R\$0,45.

Referências

ALLEY, M. L.; HAINES, D. M.; SMITH, G. W. Short communication: Evaluation of serum immunoglobulin G concentrations using an automated turbidimetric immunoassay in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4596–4599, 2012.

ALVES, R.; AZEVEDO, D.; ROBSON, E. Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento : uma revisão - Microbiological aspects of bovine colostrum in different techniques of conservation and storage : a review. **REDVET - Revista eletrônica de Veterinária**, v. 15, p. 1–13, 2014.

BORGES, A. S. *et al.* Influência da forma de administração e da quantidade fornecida de colostro sobre a concentração de proteína total e de suas frações eletroforéticas no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 629–634, 2001.

BUCZINSKI, S. *et al.* Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Accuracy of Serum

- Refractometry and Brix Refractometry for the Diagnosis of Inadequate Transfer of Passive Immunity in Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 1, p. 474–483, 2018.
- BURTON, J. L. *et al.* Variation in Serum Concentrations of Immunoglobulins G, A, and M in Canadian Holstein-Friesian Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 135–149, 1989.
- CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 87–104, 2008.
- CHIGERWE, M.; HAGEY, J. V.; ALY, S. S. Determination of neonatal serum immunoglobulin G concentrations associated with mortality during the first 4 months of life in dairy heifer calves. **Journal of Dairy Research**, v. 82, n. 4, p. 400–406, 2015.
- DAVIS, C. L.; DRACKLEY, J. K. **The development, nutrition, and management of the young calf**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1998.
- DEELEN, S. M. *et al.* Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3838–3844, 2014.
- DENISE, S. K. *et al.* Effects of Passive Immunity on Subsequent Production in Dairy Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 2, p. 552–554, 1989.
- DRIKIC, M. *et al.* Determining the IgG concentrations in bovine colostrum and calf sera with a novel enzymatic assay. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2018.
- ELSOHABY, I. *et al.* A rapid field test for the measurement of bovine serum immunoglobulin G using attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, 2015.
- ELSOHABY, I. *et al.* Quantification of bovine immunoglobulin G using transmission and attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 1, p. 30–37, 2016.
- ELSOHABY, I. *et al.* Diagnostic performance of direct and indirect methods for assessing failure of transfer of passive immunity in dairy calves using latent class analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 164, n. September 2018, p. 72–77, 2019.
- ELSOHABY, I.; KEEFE, G. P. Preliminary validation of a calf-side test for diagnosis of failure of transfer of passive immunity in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4754–4761, 2015.
- ELSOHABY, I.; MCCLURE, J. T.; KEEFE, G. P. Evaluation of Digital and Optical Refractometers for Assessing Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 721–726, 2015.
- FLEENOR, W. A.; STOTT, G. H. Single Radial Immunodiffusion Analysis for Quantitation of Colostral Immunoglobulin Concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 5, p. 740–747, 1981.
- FURMAN-FRATCZAK, K.; RZASA, A.; STEFANIAK, T. The influence of colostrum immunoglobulin concentration in heifer calves' serum on their health and growth. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5536–5543, 2011.
- GODDEN, S. Colostrum Management for Dairy Calves. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 19–39, 2008.
- GÜNGÖR, Ö.; BASTAN, A.; ERBİL, M. K. The usefulness of the γ -glutamyltransferase activity and total proteinemia in serum for detection of the failure of immune passive transfer in neonatal calves. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 155, n. 1, p. 27–30, 2004.
- HOGAN, I. *et al.* Optimisation of the zinc sulphate turbidity test for the determination of immune status. **Veterinary Record**, v. 178, n. 7, p. 169, 2016.
- LEE, S. H. *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Single Radial Immunodiffusion, and Indirect Methods for the Detection of Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 22, p. 212–218, 2008.

MCEWAN, A. D. *et al.* A turbidity test for the estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. **Clinica Chimica Acta**, v. 27, n. 1, p. 155–163, 1970.

MCGUIRK, S. M.; COLLINS, M. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 3 SPEC. ISS., p. 593–603, 2004.

PENHALE, W. J. *et al.* Quantitative studies on bovine immunoglobulins. II. Plasma immunoglobulin levels in market calves and their relationship to neonatal infection. **The British veterinary journal**, v. 126, n. 1, p. 30–32, 1970.

PFEIFFER, N. E. *et al.* Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 693–698, 1977.

PFEIFFER, N. E.; MCGUIRE, T. C. Sodium sulfite precipitation test for assessment of colostrum immunoglobulin transfer to calves.pdf. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 8, p. 809–811, 1977.

QUIGLEY, J. **Calf Note #62 – Calf Age, Total Protein and FPT in Calves**. Disponível em: <<http://www.calfnotes.com/pdffiles/CN062.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2018.

QUIGLEY, J. **Calf Note 187 - BRIX Refractometer for serum IgG**. Disponível em: <<https://www.calfnotes.com/pdffiles/CN187.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2018.

RABOISSON, D.; TRILLAT, P.; CAHUZAC, C. Failure of passive immune transfer in calves: A meta-analysis on the consequences and assessment of the economic impact. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016.

SANTOS, R. B.; SILVA, J. M.; BELETTI, M. E. Ultrastructure of bovine placenta during all gestational period. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1376–1384, 2017.

SELMAN, I. E.; MCEWAN, A. D.; FISHER, E. W. Studies on dairy calves allowed to suckle their dams at fixed time post partum. **Research in Veterinary Science**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 1971.

STONE, S. S.; GITTER, M. The validity of the sodium sulphite test for detecting immunoglobulins in calf sera. **The British veterinary journal**, v. 125, n. 2, p. 68–72, 1969.

TEIXEIRA, W. T. *et al.* Transfer of passive immunity and serum proteinogram in the first six months of life of Criollo Lageano and black and white Holstein calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 980–986, 2012.

TÓTHOVÁ, C. *et al.* Changes in the concentrations of serum proteins in calves during the first month of life. **Journal of Applied Animal Research**, v. 44, n. 1, p. 338–346, 2016.

TYLER, J. W. *et al.* Evaluation of 3 Assays for Failure of Passive Transfer in Calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)**, v. 10, n. 5, p. 304–307, 1996.

VESPASIANO, L. C. *et al.* COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS. **Vet. e Zootec.**, v. 18, n. 4, p. 334–335, 2013.

WEAVER, D. M. *et al.* Passive transfer of colostrum immunoglobulins in calves. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 6, p. 569–577, 2000.

WINDEYER, M. C. *et al.* Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 2, p. 231–240, 2014.

ANEXOS

ANEXO 1 Modelo de poços para placa de IDR

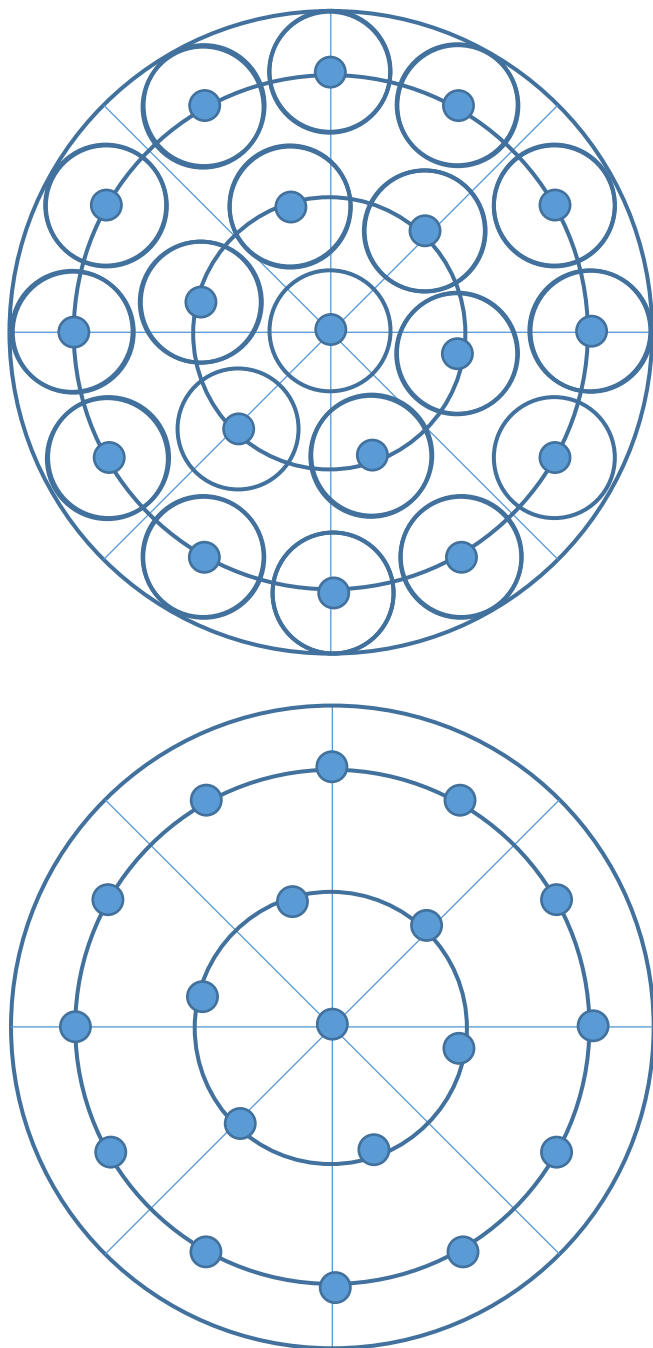


Figura 1. Modelo para ordenação de poços para placa de Imunodifusão Radial.

ANEXO 2 Protocolo IDR, Formulário e Planilha para conversão dos resultados da IDR e vídeo da técnica de IDR

[Protocolo IDR, Formulário e Planilha para conversão dos resultados da IDR](#) – Documento Excel.

[Imunodifusão radial.mp4](#) - Vídeo

ANEXO 3 Peças da patente “Teste rápido para diagnóstico da transferência de imunidade passiva em bezerros”

RESUMO

“TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS”

A presente invenção descreve um teste rápido para diagnóstico da transferência de imunidade passiva em bezerros baseado na reação química de precipitação de proteínas do soro do bezerro, mais especificamente a imunoglobulina G, com o sulfito de sódio permitindo diagnosticar a transferência de imunidade passiva nessa espécie animal. O teste rápido proposto é composto por um recipiente contendo uma solução translúcida de concentração e volume conhecidos de sulfito de sódio e um gabarito de leitura do teste. Após se despejar uma gota (50µL) do soro do bezerro neonato (de 24 a 48 horas de idade) na solução e homogeneização do conteúdo, há precipitação das proteínas e ocorre a turvação da solução em diversos níveis. Para o diagnóstico da transferência de imunidade passiva, avalia-se o nível de turvação da solução com o gabarito de leitura. Entre outras vantagens da utilização da invenção apresentada em relação a tecnologias existentes, tem-se a possibilidade de utilizá-la no campo; baixo custo considerando o valor do reagente utilizado; praticidade e rapidez da técnica, uma vez que o resultado é dicotômico e a reação é imediata e redução dos interferentes, pois não envolve nenhum equipamento para a realização do teste.

DESCRIÇÃO

“TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS”

[001] A presente invenção refere-se a um teste rápido para diagnóstico da transferência de imunidade passiva em bezerros baseado na reação química de precipitação de proteínas do soro do bezerro, mais especificamente a imunoglobulina G, com o sulfito de sódio permitindo diagnosticar a transferência de imunidade passiva nessa espécie animal. O teste rápido proposto é composto por um recipiente contendo uma solução translúcida de concentração e volume conhecidos de sulfito de sódio.

[002] A concepção de um teste rápido que determine o diagnóstico da transferência da imunidade passiva em bezerros fornece uma alternativa a métodos laboratoriais baseados em imunodifusão, eletroforese, análise bioquímica de proteínas e outras, os quais possuem custo mais elevado, qualidade variável entre os equipamentos e testes, são demoradas e não podem ser realizadas no campo.

[003] Adicionalmente, o teste rápido descrito nesta invenção representa uma solução alternativa às metodologias para diagnóstico da transferência de imunidade passiva de bezerros a campo, as quais contêm erros inerentes a calibração e manutenção dos equipamentos, além de variações na qualidade das marcas. Esse erro gera diagnósticos incorretos, podendo categorizar o indivíduo como falso positivo ou falso negativo, comprometendo o desempenho do sistema de produção, podendo causar prejuízos.

[004] No estado da técnica atual foram identificadas duas patentes indiretamente relacionadas com o escopo desta invenção, isto é, que podem ser utilizadas para avaliar a transferência de imunidade passiva de bezerros. Já em bases internacionais, foram depositadas patentes que buscam realizar o diagnóstico da transferência de imunidade passiva em bezerros, apresentando diferentes metodologias para tal diagnóstico. Entretanto, nenhuma técnica foi encontrada com as características da presente invenção, ou seja, um teste rápido, dicotômico, que pode ser usado a campo baseado na reação de precipitação do soro com a solução de sulfito de sódio.

[005] Com relação às tecnologias utilizadas a campo baseadas em refratômetro portátil para medir o índice de refração de um líquido, PI06001726A2 mede

indiretamente a concentração das proteínas ou a porcentagem BRIX da amostra de soro, podendo ser utilizada a campo para inferir a transferência de imunidade passiva de bezerros neonatos, porém trata de um equipamento que demanda calibração e manutenção constantes.

[006] Outra tecnologia utilizada a campo baseadas em refratômetro portátil é observada em PI01013610 baseada em um refratômetro digital que, assim como a técnica supracitada mede indiretamente a concentração das proteínas ou a porcentagem BRIX da amostra de soro e também demanda calibração e manutenção constante.

[007] No âmbito das tecnologias que realizam a avaliação da transferência de imunidade passiva laboratorialmente, EP0507587A2 trata de um imunoenensaio para detecção direta da imunoglobulina. Essa invenção, a qual trata de um imunoenensaio qualitativo, depende de diversos componentes, sendo eles uma amostra suspeita de conter a imunoglobulina de interesse, uma molécula pequena ligada a um receptor da imunoglobulina, um antígeno capaz de se ligar à imunoglobulina, um meio gerador de sinal ligado a um receptor para o antígeno em que o receptor é capaz de se ligar a um local no antígeno diferente do local de ligação da imunoglobulina e um suporte ao qual se liga um receptor para a molécula pequena. Esses componentes são misturados e precisam ser incubados previamente à leitura.

[008] Outra tecnologia laboratorial baseada em imunoenensaio (ELISA) para diagnóstico de imunoglobulina G bovina, CN101329339A utiliza-se de um kit que compreende a seção Fc da imunoglobulina bovina G e o anticorpo específico da seção Fc da imunoglobulina bovina G; o anticorpo específico e o anticorpo clone-múltiplo ou anticorpo clone-único da seção Fc da imunoglobulina bovina G. A técnica de ELISA é complexa, demorada e precisa ser realizada em laboratório por profissional com domínio da técnica.

[009] Com relação às tecnologias que utilizam técnicas de imunorreação, US8597894B2 detecta a imunoglobulina A de ungulados em fluidos orais, avaliando a transferência de imunidade passiva. Essa tecnologia difere da presente invenção por utilizar outra fonte de amostra (saliva) e avaliar outra classe de imunoglobulina (imunoglobulina A).

[010] A tecnologia utilizada em US005645834A se limita à descrição de um produto e de um método para o tratamento da falha da transferência da imunidade passiva após o fechamento intestinal para a passagem de imunoglobulinas do colostro.

[011] A presente invenção baseia-se exclusivamente na reação química de precipitação de proteínas do soro do bezerro, mais especificamente a imunoglobulina G, com o sulfito de sódio. Seu principal objetivo é diagnosticar a transferência de imunidade passiva em bezerros utilizando uma metodologia simples, de baixo custo, que possa ser viável em diversas condições de fazendas e ser aplicável a campo. Para tanto, o teste rápido é composto por um recipiente contendo uma solução translúcida de concentração e volume conhecidos de sulfito de sódio, como pode ser observado na Figura 1. Após se despejar uma gota (50 μ L) do soro do bezerro neonato na solução e homogeneização do conteúdo, há precipitação das proteínas e ocorre a turvação da solução em diversos níveis. Com base na intensidade da turvação da solução após a adição da amostra, é possível dar o diagnóstico da transferência de imunidade passiva do indivíduo como adequada transferência de imunidade passiva ou falha na transferência de imunidade passiva. Para o diagnóstico da transferência de imunidade passiva é necessário que a solução turve ao ponto de impossibilitar a visualização das listras do gabarito de leitura do teste através do recipiente do mesmo (ponto de corte do teste). Assim, caso o bezerro tenha absorvido imunoglobulinas suficientes do colostro materno para adquirir imunidade passiva adequada, essas proteínas reagirão com o sulfito de sódio da solução e turvarão essa ao ponto de impedir a visualização das listras do gabarito de leitura através do recipiente do teste, obtendo-se, então, um diagnóstico de Adequada Transferência de Imunidade Passiva daquele animal. Caso o bezerro não tenha absorvido imunoglobulinas suficientes do colostro materno para adquirir imunidade passiva adequada, essas proteínas reagirão pouco com o sulfito de sódio da solução de forma a não turvar essa o suficiente, impossibilitando a visualização das listras do gabarito de leitura através do recipiente do teste, obtendo-se, então, um diagnóstico de Falha na Transferência de Imunidade Passiva daquele animal.

[012] Uma característica da presente invenção compreende medir os níveis de imunoglobulina no soro do bezerro no momento em que a concentração de imunoglobulinas séricas é máxima após a absorção de colostro. Desse modo, especialistas na arte recomendam que a avaliação da transferência de imunidade

passiva de bezerros seja realizada entre 24 e 48 horas de vida, para maior acurácia da análise.

[013] Essas características do teste rápido o diferenciam das soluções encontradas no estado da técnica, já que o mesmo:

- Possui baixo custo, por utilizar produto químico (sulfito de sódio P.A.) de amplo acesso e baixo custo;
- Viabiliza a o diagnóstico a campo da transferência de imunidade passiva em bezerros;
- Identifica rapidamente a condição do bezerro quanto à transferência de imunidade passiva, permitindo o monitoramento imediato e reduzindo erros inerentes à equipamentos disponíveis no estado da técnica para uso a campo;
- Fornece uma forma acurada e dicotômica para o diagnóstico da transferência de imunidade passiva em bezerros.

[014] A seguir é descrito o funcionamento do sistema, cuja visão geral é apresentada na Figura 1. O recipiente do teste rápido contém a solução de sulfito de sódio em concentração e volumes conhecidos. Nesse recipiente, adiciona-se uma gota da amostra de soro do bezerro de 24 a 48 horas de idade e homogeneíza-se a mistura. A leitura do teste pode ser realizada imediatamente.

[015] Para analisar o resultado do teste, é necessário posicionar o recipiente do teste a frente do gabarito para tentar visualizar as listras do gabarito de leitura através do recipiente. O ponto de corte do teste é a não-visualização das listras do gabarito de leitura através do recipiente. Caso haja turvação na solução do recipiente suficiente para impedir a visualização das listras do gabarito de leitura, o indivíduo avaliado é classificado como apresentando Adequada Transferência de Imunidade Passiva. Caso não haja turvação no recipiente ou ela seja discreta e não impeça a visualização das listras do gabarito de leitura, o indivíduo avaliado é classificado como apresentando Falha na Transferência de Imunidade Passiva.

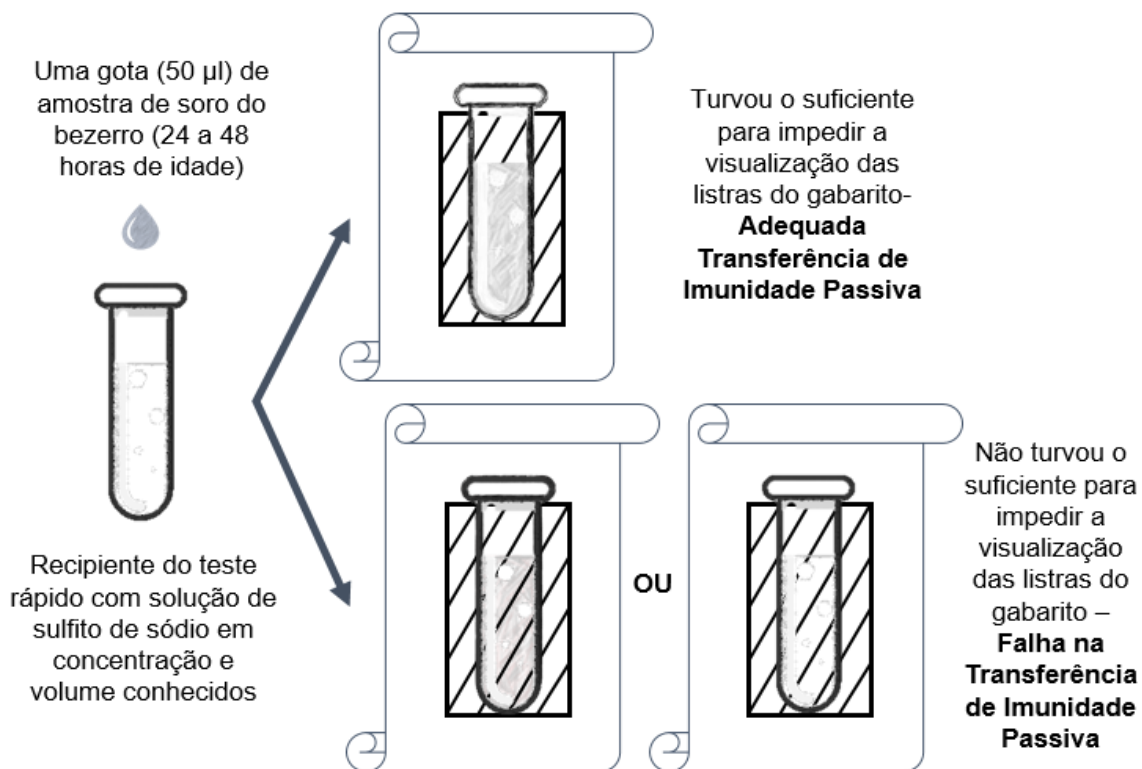
[016] Com base nas etapas descritas anteriormente, a presente invenção é capaz diagnosticar, portanto, a transferência de imunidade passiva em bezerros, aprimorando a eficiência deste processo nas fazendas. Ao utilizar esse teste rápido, seus potenciais usuários como, por exemplo, proprietários e funcionários das

fazendas ganham em portabilidade, agilidade e redução dos custos do processo de monitoramento da transferência da imunidade passiva dos bezerros.

FIGURA

Fig. 1

TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS



REIVINDICAÇÕES

1. **“TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS”**, caracterizado por um processo de diagnóstico da transferência de imunidade passiva em bezerros, por meio da reação química de precipitação de proteínas do soro do bezerro, mais especificamente a imunoglobulina G, com o sulfito de sódio.

2. **“TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um teste dicotômico, que permite avaliar se o bezerro apresenta adequada transferência de imunidade passiva ou apresenta falha na transferência da imunidade passiva.

3. **“TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS”**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por avaliar o soro do bezerro entre 24 e 48 horas de idade com o gabarito de leitura do teste.

4. **“TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS”**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3 caracterizado por fornecer o resultado imediatamente após a adição da amostra de soro e homogeneização.

5. **“TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS”**, caracterizado por um processo que inclui as seguintes etapas:

- Inclusão de uma gota (50µL) amostra de soro do bezerro neonato (24 a 48 horas de idade) no recipiente contendo solução de sulfito de sódio em volume e concentração conhecida;
- Homogeneização da mistura;
- Análise imediata do resultado posicionando o recipiente em frente a um gabarito para avaliar se é possível visualizar as listras do mesmo ou não;
- Caso haja turvação na solução do recipiente suficiente para impedir a visualizar as listras do gabarito, o indivíduo avaliado é classificado como apresentando Adequada Transferência de Imunidade Passiva ou caso não haja turvação no recipiente ou ela seja discreta e não impeça a visualizar as listras

do gabarito através do recipiente, o indivíduo avaliado é classificado como apresentando Falha na Transferência de Imunidade Passiva.

6. “TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM BEZERROS”, que caracterizado pelas reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5 seja capaz de prover os seguintes serviços:

- Diagnosticar a transferência de imunidade passiva em bezerros neonatos;
- Fornecer resultado dicotômico e eficiente da transferência de imunidade passiva em bezerros neonatos (24 a 48 horas de idade);
- Ser uma técnica barata, simples e rápida para o diagnóstico a campo da transferência de imunidade passiva em bezerros neonatos;