

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
ELIZABETH MOREIRA DIAS

**Avaliação dos níveis de IgA em amostras do colostro contra bactérias  
envolvidas em infecções neonatais.**

UBERABA

2015

ELIZABETH MOREIRA DIAS

**Avaliação dos níveis de IgA em amostras do colostro contra bactérias  
envolvidas em infecções neonatais.**

Dissertação apresentada para Defesa de Mestrado  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Odontologia, área de concentração:  
Biopatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira  
Geraldo-Martins

Uberaba  
2015

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central

**Dias, Elizabeth Moreira.**

D543a Avaliação dos níveis de IgA em amostras do colostro contra bactérias envolvidas em infecções neonatais / Elizabeth Moreira Dias. – Uberaba, 2015.

43 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia, 2015.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo-Martins.

1. Enterobactérias. 2. Staphylococcus aureus. 3. Colostro. 4.

Imunoglobulina A. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. II. Título.

CDD 614.57

ELIZABETH MOREIRA DIAS

**Avaliação dos níveis de IgA em amostras do colostro contra bactérias envolvidas em infecções neonatais.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Biopatologia

Aprovada em: 20/03/2015

BANCA EXAMINADORA:



Prof.<sup>a</sup> Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues  
Universidade de Uberaba



Prof.<sup>a</sup> Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins  
Universidade de Uberaba



Prof.<sup>a</sup> Dra. Virginia Resende Silva Weffort  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

## **DEDICATÓRIA**

Dedico de forma especial à minha mãe, Helenice, que desde cedo me ensinou a importância de buscar conhecimentos, e aos meus filhos, Felipe e Rafael, amor incondicional, a continuidade.

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade de Uberaba, por meio do Reitor Prof. Dr. Marcelo Palmério.

A Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão por meio do Pró-Reitor Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins pelos ensinamentos

Aos Professores do Mestrado, minha eterna gratidão pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos colegas do curso de Mestrado Bárbara Bellochio Bertoldo e Elina Tosta de Oliveira

Às técnicas de laboratório Camila Beatriz Silva e Karina Passaglia de Azevedo pela colaboração nos procedimentos laboratoriais, pela amizade

A secretaria do curso de pós-graduação e extensão Flávia Michele da Silva pela prontidão em atender.

A todos os funcionários da Universidade Uberaba, agradeço pelo trabalho executado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta dissertação pudesse ser realizada.

“A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS E CONCRETIZADA NO AMOR”

*Chico Xavier*

## RESUMO

Após o nascimento, os recém-nascidos são expostos a vários tipos de micro-organismos. Alguns destes podem determinar processo infeccioso devido a sua imaturidade imunológica. Dentro deste processo, a amamentação tem um papel importante oferecendo anticorpos passivamente, principalmente a imunoglobulina A, na sua forma secretora (IgAS). *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) estão entre as principais bactérias responsáveis pelo grande número de infecções neonatais graves, especialmente em bebês prematuros. No entanto, pouco se sabe sobre a especificidade dos anticorpos IgA do colostro contra tais espécies. Nesse sentido, buscou-se avaliar a presença e a especificidade de anticorpos IgA do colostro de 48 mães contra extratos proteicos dessas bactérias e compará-las entre si. As amostras foram colhidas assepticamente nas primeiras 24 horas pós parto. A especificidade de IgA contra tais extratos bacterianos foi analisada por ensaios de Western blot. A presença de IgAS específica contra antígenos de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. enteritidis* e *S. aureus* foi encontrada respectivamente em 53%, 60%, 62% e 93% das amostras de colostro. As IgAS mais detectadas foram as que reagiram contra antígenos de maior peso molecular, como o do *S. aureus* de peso molecular de 230 kDa, encontrado em 56% das amostras. No entanto, cerca de 40% das amostras não apresentaram IgA reativo a *K. pneumoniae*, *S. enteritidis* ou *E. coli*, denotando uma lacuna na proteção conferida por estas amostras. Desta maneira, concluiu-se que as evidências clínicas da importância do aleitamento materno para a proteção imunológica do neonato estão condizentes com os achados imunológicos observados, já que, a maioria das amostras apresentaram IgAS reativo contra as espécies testadas. No entanto, a aplicação e desenvolvimento de imunoterapias durante a gestação, utilizando-se os antígenos frequentemente detectados, poderiam ser uma ferramenta importante para potencializar a presença de IgAS no colostro.

**Palavras-chave:** enterobacteriaceae , *Staphylococcus aureus*, colostro, Imunoglobulina A secretora

## ABSTRACT

After birth, newborns are exposed to a several types of microbial antigens. Some of which can determine an infection due to the their immunological immaturity. Breastfeeding plays an important role against these microorganisms by offering immunoglobulin A (IgA). *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) are among the main bacteria responsible for the large number of serious infections, especially in premature babies. In this respect, we aimed to assess the specificity of IgA antibodies from the colostrum of 48 mothers against antigens of those bacterias, and compare them with each other. Then, colostrum samples were collected aseptically in the first 24 hours after delivery. The specificity of IgA against extracts of those bacteria was analyzed by the western blot. The results showed that the high molecular weight proteins were more frequently detected. 93% of the samples had IgA against *S. aureus* ( $p<0.05$ ) and many reactive bands were observed ( $p<0.05$ ). Other bacteria have also been recognized by colostrum IgA, but only 53%, 62% and 60% samples, respectively, for *K. pneumoniae*, *S. enteritidis* and *E. coli*. These results collaborate with other studies that showing the importance of breastfeeding in the control neonatal infections. However, about 40% of the samples showed no reactive IgA to *K. pneumoniae*, *S. enteritidis* and *E. coli*. In conclusion, the clinical evidence of the importance of breastfeeding for the immune protection of the neonate was consistent with the observed immunological findings, since most samples showed IgAS reactive against those species tested. However, the application and development of immunotherapies during pregnancy, focused in the frequently detected antigens could be an important tool to enhance the presence of IgAS in colostrum.

**Keywords:** enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, colostrum, Immunoglobulin A Secretary

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	08
<b>2. HIPOTESE</b>	13
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	14
<b>4. OBJETIVOS</b>	15
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	16
5.1- Delineamento Experimental.	16
5.2 - Coleta de amostras e níveis de imunoglobulinas	16
5.3 - Ensaio para análise da complexidade de resposta de IgA contra antígenos de <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i>	17
5.4 - Análise Estatística	19
<b>6. RESULTADOS</b>	20
<b>7. DISCUSSÃO</b>	26
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	30
<b>9. CONCLUSÃO</b>	31
<b>10 . REFERÊNCIAS</b>	32
<b>11. ANEXOS</b>	37

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 6,3 milhões de crianças com idade inferior a 5 anos morreram em 2013 e destas, 45% no período neonatal. Este é o período mais vulnerável para a sobrevivência de uma criança (WHO, 2013). A infecção bacteriana neonatal continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade neste período, apesar dos avanços tecnológicos significativos. No Brasil, estima-se que aproximadamente 60% das causas de mortalidade infantil ocorrem durante o período neonatal, sendo as “infecções relacionadas a assistência a saúde”, uma das principais causas, chegando a afetar mais de 30% dos neonatos. (Silva *et al.*, 2013)

A maior suscetibilidade à infecção bacteriana neonatal é explicada, em parte, pela imaturidade imunológica relativa do recém-nascido, que é consequência direta da adaptação imunológica durante o período transitório da vida intra para a extra-uterina (Mussi-Pinhata *et al.*, 2001, Chirico *et al.*, 2008). A ontogenia do sistema imunológico começa mais cedo no embrião e continua durante a vida fetal, mas é completado somente alguns anos após o nascimento (Chirico *et al.*, 2008; Hanson *et al.*, 1990). No entanto, práticas hospitalares, maternas e obstétricas, podem contribuir para a ocorrência de contaminação bacteriana que podem resultar em infecções gastrointestinais e respiratórias (Manjarrez-Hernandez *et al.*, 2000), bem como a sepse neonatal, com um envolvimento sistêmico (Silva *et al.*, 2013).

A sepse neonatal, a terceira causa mais comum de morte no início da vida, resulta em meio milhão de mortes a cada ano, sendo que a grande maioria dos casos está em países em desenvolvimento (Downie *et al.*, 2013). Dados de estudo de coorte indicaram que as taxas de infecção em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) foram maiores na América Latina do que nos países desenvolvidos (37% e 15%, respectivamente). Aproximadamente um terço dos pacientes latino-americanos que adquiriram infecção em UTIN foram a óbito, sendo esta taxa maior entre os de neonatos de baixo peso extremo ao nascer (Berezin *et al.*,

2014). A sepse aumenta significativamente os custos tanto na UTIN quanto no acompanhamento social e educacional das crianças que sobrevivem com “déficits” no desenvolvimento neurológico (Patel *et al.*, 2013). Estes “déficits”, inclusive paralisia cerebral, ocorrem devido a exposição do cérebro prematuro a mediadores inflamatórios durante processos infecciosos levando a hemorragia cerebral e a lesão da substância branca (Silveira *et al.*, 2010).

Os patógenos mais comumente isolados e implicados nas infecções neonatais, nos países em desenvolvimento, são *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Jyothi *et al.*, 2013, Downie, 2013).

Dentre estas, a *E. coli* está entre as principais bactérias envolvidas na sepse neonatal (Zaidi *et al.*, 1991, Couto *et al.*, 2007). Em condições normais, esta espécie coloniza o trato gastrointestinal do neonato, dentro de algumas horas de vida e desenvolve uma relação de mutualismo com o hospedeiro (Nataro *et al.*, 1998). Alguns sorotipos de *E. coli*, tais como: *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroagregativa e *E. coli* enterotoxigênica foram relatados como os principais causadores de diarreias em crianças de até um ano de idade (Gomes *et al.*, 1996; Nataro *et al.*, 1998; Franzolin *et al.*, 2005; Orlandi, *et al.*, 2006). Também o sorotipo O6 de *E. coli* foi detectado em muitos neonatos com meningite (McCracken *et al.*, 1974) e septicemia (Freij *et al.*, 1999). Outra síndrome clínica que resulta de cepas patogênicas é Infecção do Trato Urinário (Nataro *et al.*, 1998).

Uma outra bactéria relevante nas infecções gastrointestinais neonatais é a *S. enteritidis*, sendo que no recém-nascido, a infecção por esta bactéria geralmente ocorre após a 1ª semana de vida, gerando uma gastroenterite aguda e causando sérias complicações para o neonato, como sepse e/ou meningite (Ferreira *et al.*, 2007).

*S. aureus* tem sido associada a várias infecções no período neonatal, como sepse neonatal tardia (Downie *et al.*, 2013), impetigo (Jursa-Kulesza *et al.*, 2009), artrite e osteomielite (Montgomery *et al.*, 2013). Os principais antígenos de *S. aureus* são predominantemente relacionados com a superfície bacteriana, tais como polissacarídeos capsulares, ácido teicóico, peptidoglicano, adesinas e proteína A, e também suas toxinas (Holtfreter *et al.*, 2010).

*Klebsiella spp* são patógenos oportunistas que dão origem a pneumonia, bacteremia e infecções do trato urinário (Escobar *et al.*, 1996) e é relatada como um agente comum em casos de sepse neonatal (Jyothi *et al.*, 2013; Vijayakanthi *et al.*, 2013), sendo associada às altas taxas de morbidade e mortalidade, muitas vezes através de cepas multirresistentes a antibióticos associados à produção de beta-lactamase (Vijayakanthi *et al.*, 2013).

Após o nascimento, com a interrupção da transferência de IgG via cordão umbilical, a mãe tem a possibilidade de oferecer ao recém nascido, uma outra forma de proteção passiva, representada pelo aleitamento materno, que possui propriedades protetoras indiscutíveis (Hanson *et al.*, 1998). Comparações entre crianças alimentadas com fórmulas e em aleitamento materno exclusivo mostram que o leite materno reduz os quadros de infecção em bebês, especialmente aqueles que vivem em más condições de higiene (Yoon *et al.*, 1996, Barros, 1982). A gravidade de infecções gastrointestinais e respiratórias é muito menor em lactentes amamentados ao seio do que em crianças alimentadas com mamadeira (Tomicic *et al.*, 2010; Hanson *et al.*, 1998), aumentando assim, as chances de sobrevivência para as crianças no primeiro ano de vida (Glass *et al.*, 1989; Chirico *et al.*, 2013, Hanson *et al.*, 1990). A amamentação, mesmo não exclusiva, diminuiu o risco de sepse neonatal quando comparados com crianças não amamentadas em país em desenvolvimento (Hanson *et al.*, 1998). Crianças que não receberam leite materno ou o receberam parcialmente tiveram 2,23 vezes risco maior de morrer que as em aleitamento exclusivo, durante os 4 primeiros meses de vida e 2,40 e 3,94 vezes maior de morte devido a infecções respiratórias e diarreia

respectivamente. (Arifeen, 2001). Pretermos apresentaram significante menor índice de enterocolite necrotizante quando recebiam leite materno parcial ou exclusivo (Araújo et al, 2005)

O leite materno e o colostro contêm uma infinidade de componentes da imunidade inata e específica, aumentando as condições para uma vida saudável de um bebê, como as imunoglobulinas (Hanson *et al.*, 1985, 1990), cujas concentrações são muito elevadas no colostro, onde constituem a maior parte do conteúdo proteico, chegando a mais de 90% no primeiro dia de lactação (Araújo *et al.*, 2005; Barros,1982). Os níveis de IgA são maiores em pretermos do que nos a termos (Araújo *et al.*, 2005; Chirico *et al.*, 2013; Rupulo *et al.*, 1998). Ambos apresentam uma redução nestas concentrações com o decorrer da lactação, porém a quantidade de anticorpos ingeridos permanece inalterada, nos 2 a 3 primeiros meses de vida em virtude do aumento do consumo de leite (Araújo *et al.*, 2005; Barros, 1982).

A IgA é a principal imunoglobulina do leite humano, estando em sua forma secretora (IgAS). A segunda maior classe de imunoglobulina encontrada no leite materno é a IgM que tem níveis muito parecidos com os encontrados em soro humano. Outra imunoglobulina, que vale destaque, é a IgG que se apresenta em concentrações muito menores que as outras imunoglobulinas e diminui ao longo da lactação (Brandtzaerg, 2013; Araújo *et al.*, 2005).

O papel da IgAS do colostro, frente a antígenos bacterianos, é o de aglutinação, impedindo sua aderência às superfícies mucosas, não permitindo que atravessem a barreira epitelial, protegendo o recém-nascido contra a invasão microbiana e também o de neutralizar as toxinas liberadas pelos patógenos (Hanson,1998; Hurley *et al.*, 2011; Grassi *et al.*, 2001). Não possui atividade opsonica, mas pode induzir a fagocitose pelos neutrófilos (Grassi *et al.*, 2001; Rupulo, 1998). Apresenta uma limitada ativação do complemento, o que permite agir de uma maneira não inflamatória (Hurley *et al.*, 2011), sem dano tecidual e sem gasto de energia, importante para um organismo que necessita de energia para o seu crescimento e

desenvolvimento (Hanson,1998). Por apresentar resposta local e meia-vida curta, a IgAS nem sempre protege contra a reinfecção (Rupulo, 1998).

O reconhecimento do espectro de anticorpos antibacterianos oferecidos pelo leite materno é de grande interesse, pois possibilita o entendimento sobre a função destes no desenvolvimento pós-natal e controle de uma flora normal ou patogênica do trato gastrointestinal. Assim, a amamentação pode proporcionar uma fonte natural de um amplo espectro de anticorpos maternos maduros no lactante e resultando em uma imunização passiva do bebê já que recebe anticorpos contra patógenos ambientais que podem ser infecciosos (Hanson *et al.*, 1998)

Ao contrário de muitas espécies de animais, como roedores e gado, em seres humanos, os anticorpos do leite materno não atravessam a camada epitelial da mucosa, por isso não entram na circulação do recém-nascido, dando apenas uma proteção contra microrganismos transitórios locais (van de Perre, 2003). Sendo a cavidade bucal, a porta de entrada de inúmeras espécies microbianas, esta transmissão passiva de anticorpos de mãe para o feto, representa a primeira linha de defesa das mucosas, conferindo proteção contra infecções e revestindo as superfícies mucosas, impedindo a adesão e invasão nos tecidos contra uma variedade de micro-organismos (Hanson, 1998, van de Perre, 2003).

## 2. HIPÓTESE

Com base nas relevantes propriedades clínicas e evidências epidemiológicas que o aleitamento materno apresenta contra infecções bacterianas de neonatos (nas sepses e gastroenterites), espera-se que amostras de colostro apresentem elevados níveis de IgAS específico contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. enteritidis*, imunizando passivamente o neonato.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A literatura traz poucas informações a respeito desta resposta e especialmente a especificidade da IgAS contra antígenos das bactérias testadas, daí a importância do presente estudo.

## **4 . OBJETIVOS**

### **4.1 GERAL**

Avaliar a presença de anticorpos IgAS em amostras de colostro, contra espécies envolvidas em infecções neonatais, tais como *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. enteritidis* e *E. coli*, comparar suas prevalências, para elucidar a proteção imunológica adaptativa conferida pela mãe através da amamentação, em uma população brasileira contra tais infecções.

### **4.2 ESPECÍFICO**

Verificar os antígenos das bactérias *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. enteritidis* e *E. coli* reconhecidos por IgAS de colostro, com seus pesos moleculares, identificando os mais frequentes, comparando os resultados.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Delineamento experimental**

Um total de 48 mães foram incluídas neste estudo, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) com direito de interrupção em qualquer momento do estudo. O Comitê de Ética da Universidade de Uberaba (UNIUBE) (Anexo 1) e o Comitê de Ética da USP de Ribeirão Preto (Anexo2) aprovaram a realização deste estudo. Os critérios de inclusão foram: mães saudáveis, sem estar utilizando quaisquer medicamentos que interferissem na lactação, sem nenhuma intercorrência durante a gravidez ou no parto, sendo este a termo (acima de 39 semanas de gestação). As coletas do colostro foram realizadas no período matutino, com menos de 24 horas após o parto na MATER (Centro De Referência Em Saúde Da Mulher do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo). Estas amostras foram processadas e analisadas nos Laboratórios de Biopatologia e de Microbiologia da UNIUBE.

### **4.2. Coleta de amostras e níveis de imunoglobulinas**

As amostras de colostro foram coletadas por expressão manual em tubos de polipropileno estéreis de 15 mL, nas primeiras 24 horas após o parto, no período matutino. Após a coleta, as amostras maternas foram transportadas em gelo para o laboratório, centrifugado a 1300 xg durante 7 min para remover os componentes lipídicos e armazenadas a -80°C até a realização dos imunoenaios.

A concentração das imunoglobulinas nas amostras de colostros utilizadas neste estudo foram avaliadas por ELISA previamente em outro estudo. Os níveis médios de IgA foi 2850 mg/100mL; de IgM 321,8 ( $\pm$  90,3) e de IgG, 88,3 ( $\pm$  51,5) (Petrechen *et al.*, 2015).

### **4.3. Ensaio para análise da complexidade de resposta de IgA contra antígenos de *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus* e *K. pneumoniae***

#### **4.3.1. Preparação de antígenos de bactérias**

Padrões de reatividade de anticorpos IgAS contra antígenos de *S. aureus* (ATCC 25923), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *S. enteritidis* (ATCC 13076) e *E. coli* (ATCC 11303) foram determinadas em ensaios de Western blot. Células foram obtidas de 15 mL de material das culturas, após centrifugação a 1.300 xg a 4°C, durante 10 min. . Absorbâncias foram ajustadas para A<sub>600nm</sub>=1 e então separadas. Aos precipitados de células acrescentou-se água destilada tampão desnaturante 0,25M Tris HCl pH 6.8 (contendo 8% SDS, 20% de ditioneitol 1M, 30% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol) na proporção de células de 1mL de cultura para 15uL de H<sub>2</sub>O e 15uL de tampão desnaturante. As suspensões celulares foram então fervidas durante 5 minutos para extração das proteínas e inativação de proteinases. A seguir os extratos foram imediatamente colocados em banho de gelo e congelados a -80° C. Para monitoramento do padrão de antígenos destes extratos, alíquotas dos mesmos foram analisadas em géis de poliacrilamida-SDS corados com Coomassie Blue R 250.

#### **4.3.2. Análise da complexidade de resposta de IgA contra antígenos bacterianos em ensaios de western blot**

As proteínas das preparações de antígenos descritas no item 3.4.1 foram separadas por 3 horas a 24 mA/gel em géis duplicata de poliacrilamida-SDS a 6% preparados com auxílio de sistema de mini-géis Mini Protean II (BioRad, CA, USA). Após separação eletroforética das proteínas nos géis duplicata, um destes foi transferido para membrana de nitrocelulose (BioRad, CA, USA) durante 1,5h a 50V constantes, com auxílio de aparato Mini TransBlot (BioRad, CA, USA). O segundo gel foi corado com Coomassie Blue R250 (Sigma, MO, USA) para análise do padrão dos antígenos separados. Padrões de pesos moleculares pré-corados (BioRad, CA, USA) foram incluídos em todos os géis. As membranas de

nitrocelulose contendo os antígenos, foram então bloqueadas através da incubação a 4°C “overnight” com tampão de bloqueio TBST (100mM Tris com 10% Tween) pH 7,5 contendo 5% de leite desnatado. A seguir, as mesmas foram incubadas com amostras de colostro diluídos 1:4.000) no mesmo tampão durante 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação. Como controles negativos, membranas duplicata foram incubadas apenas com TBST mais 5% de leite em pó desnatado. Após 8 lavagens de 10 minutos cada com 80mL de TBST pH 7,5, as membranas foram incubadas por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente, com anticorpo purificado de cabra anti-IgA humana conjugado com peroxidase (Zymed/Invitrogen, CA, USA), diluído 1:4000 em TBST com 5% de leite em pó desnatado. Nova série de 8 lavagens durante 10 minutos cada, foi então realizada.

A seguir, as reações com anticorpo secundário foram reveladas usando-se o sistema quimioluminescente ECL (Amersham, NJ, USA). A detecção das bandas de antígenos reconhecidos por Ig foram detectadas através da exposição de filmes de raios X (Kodak, NY, USA) às membranas durante 5 minutos. Após a revelação dos filmes sensibilizados, imagens digitais de alta resolução dos mesmos foram capturadas em scanner (BioRad), para evidenciar a presença ou a ausência das bandas, cujo peso molecular foi calculado através de uma equação baseada no peso molecular padrão utilizado. Os géis em duplicata para análise do padrão de antígenos testados foram incubados com solução de 7% ácido acético e 10% metanol, durante 15 minutos e, a seguir, corados por 2 horas com solução de Coomassie Blue filtrado (0,1% Coomassie Blue, 50% metanol e 10% de ácido acético). Após isto, os géis foram novamente incubados com solução descorante (7% de ácido acético e 10% de metanol) durante 18h. Os géis foram então lavados com solução de glicerol a 10% e secados entre folhas de celofane.

#### **4.4. Análises estatísticas.**

As comparações das frequências de amostras de colostro com diferentes especificidades de anticorpos IgA foram realizadas pelo teste do qui-quadrado. O número médio de bandas de IgA reativos em extratos de antígenos também foi determinado. Apresentaram distribuição normal. Os valores foram expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão, e a comparação entre os grupos foi realizada por meio de ANOVA. A frequência das amostras mais detectadas com seus respectivos pesos moleculares, também foram analisadas e comparadas por meio de ANOVA. As correlações entre as concentrações de IgA específica e padrões de reações de anticorpos entre as amostras foram testadas por análise de correlação de Pearson. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O teste de Normalidade foi o D-Agostini-Pearson e o programa utilizado BioSTAT.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Resposta de IgA específica contra extratos bacterianos.

Na figura 1, observamos 3 imunoenaios de amostras distintas de colostro contra as bactérias testadas. Na Tabela 1, a frequência de amostras (n=48), com resultados positivos e negativos para as quatro bactérias testadas. Foi considerado positivo, quando aparecia pelo menos uma banda detectável. A maioria das amostras apresentou IgA reativa para bactérias testadas. O *S. aureus* foi mais detectado em relação a outros extratos, seguindo por *S. enteritidis*, *E. coli* e *K. pneumoniae*.

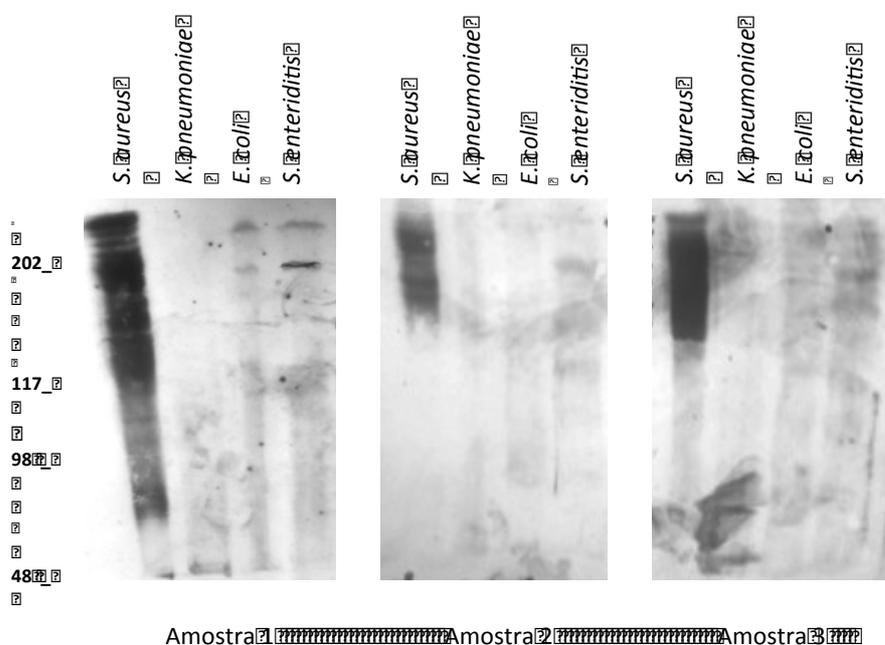


Figura 1. Imunoenaios de amostras de colostros (1, 2 e 3) contra os extratos bacterianos de *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* e *K. pneumoniae*

Tabela1. Número de amostras com resposta positiva e negativa de IgA contra os extratos bacterianos.

Bactéria	Número de amostras (%)	
	Resposta Positiva	Resposta Negativa
<i>S. aureus</i>	45 (93,8) <sup>1,2,3</sup>	3 (6,2) <sup>1,2,3</sup>
<i>K. pneumoniae</i>	27 (56,3) <sup>2-</sup>	21 (43,7) <sup>2</sup>
<i>E. coli</i>	29 (60,4) <sup>1-</sup>	19 (39,6) <sup>1</sup>
<i>S. enteritidis</i>	30 (62,5) <sup>3</sup>	18 (37,5) <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Qui-quadrado, p=0.001, q=15.10

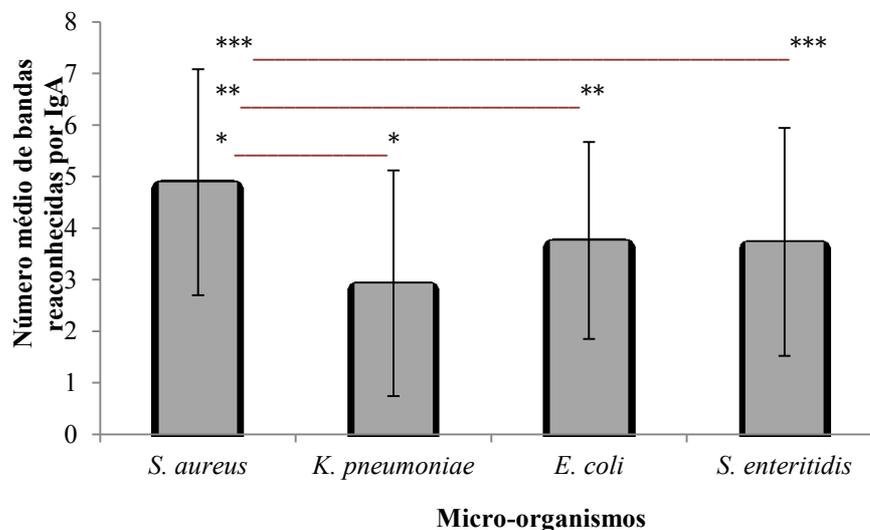
<sup>2</sup> Qui-quadrado, p=0.001, q=18.00

<sup>3</sup> Qui-quadrado, p=0.001, q=17.10

## 5.2. Complexidade da resposta de IgA contra antígenos bacterianos.

A complexidade de resposta de IgA das amostras de colostro contra os extratos de bactérias foram definidos pelo número de bandas de IgA-reativas identificadas nas amostras. Este número contra *S. aureus*, variou de 2 a 11 (média:  $4,89 \pm 2,19$ ), contra *K. pneumoniae* de 1 a 11 (média:  $2,93 \pm 2,19$ ), contra *S. enteritidis*, de 1 a 11 (média:  $3,73 \pm 2,21$ ), e contra *E. coli* de 1 a 8 (média:  $3,76 \pm 1,911$ ). Na Figura 2, verificamos o número médio das resposta das bandas IgA-reativas aos antígenos microbianos de *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* e *K. pneumoniae*, sendo comparadas utilizando ANOVA.

Figura 2. Número médio de bandas em amostras com IgA reativos aos antígenos bacterianos de *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* e *K. pneumoniae*

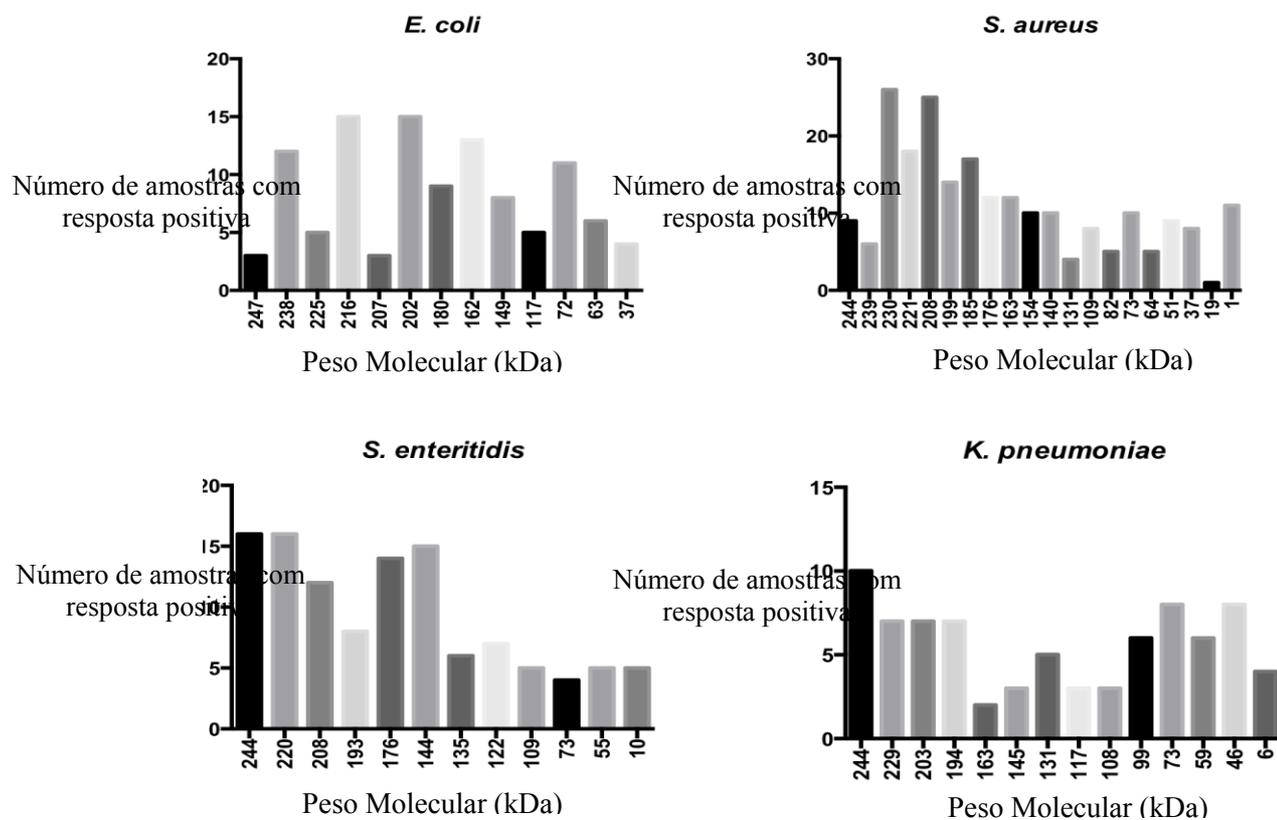


\*p=0,02 \*\*p=0,02 \*\*\*p=0,04, ANOVA

### 5.3. Especificidade da IgA do colostro contra as bandas dos extratos bacterianos separados pelo SDS-page.

O rastreamento das bandas reconhecidas por IgA, detectadas nos extratos bacterianos, foram analisadas e o seu peso molecular (kDa) calculado pela equação obtida através da análise das bandas do peso molecular padrão. Na Figura 3, observamos os valores dos pesos moleculares das bandas detectadas por IgA contra os extratos bacterianos nas amostras testadas. Houve uma grande variação nas bandas reconhecidas por IgA para cada extrato bacteriano, sendo que a maioria dessas, apresentaram um de elevado peso molecular, variando entre 247 a 109 kDa. Uma banda de peso molecular de 244 KDa foi comum em amostras de *S. aureus*, *S. enteritidis* e *K. pneumoniae*, não houve correlação entre eles.

Figura 3. Bandas detectadas em cada extrato bacteriano com seus respectivos pesos moleculares (kDa) e número de amostras que apresentaram resposta positiva.



Foram detectadas cerca de 59 bandas de diferentes pesos moleculares. Na Tabela 2, observamos a frequência de amostras que apresentaram IgA reativos às bandas mais frequentemente detectadas e os seus respectivos pesos moleculares. Dentre as amostras, a resposta de IgA contra *S. aureus* apresentou a maior diversidade, já que 20 tipos distintos de bandas foram detectados ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2. Números de bandas reconhecidas nas amostras que apresentaram pelo menos uma banda detectável nos imunoenaios com *S. aureus* (n=45), *S. enteritidis* (n=30), *K. pneumoniae* (n=27) e *E. coli* (n=29). Frequência e porcentagem das amostras com IgA reativas contra bandas mais frequentemente detectadas e seus respectivos pesos moleculares (kDa)

Peso molecular das bandas reativas de:	N. amostras com IgA reativas (%)	N. total de bandas detectadas
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>		20
230	26 (57.8)	
221	18 (40.0)	
208	25 (55.6)	
185	17 (37.8)	
<b><i>Salmonella enteritidis</i></b>		12
244	16 (53.4)	
220	16 (53.4)	
176	14 (46.7)	
144	15 (50.0)	
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>		14
244	10 (37.0)	
229	7 (25.9)	
203	7 (25.9)	
194	7 (25.9)	
73	8 (29.6)	
46	8 (29.6)	
<b><i>Escherichia coli</i></b>		13
238	12 (41.4)	
216	15 (51.7)	
202	15 (51.7)	
162	13 (44.8)	

Podemos observar que as frequências de IgA reativas contra as bandas de alto peso molecular de *S. aureus*, na Tabela 2, com exceção da de 185 kDa, foram estatisticamente maiores do que para as outras bandas encontradas na Figura 3 ( $p < 0,05$ ). Mais de 55% das amostras, com resposta positiva para *S. aureus*, apresentaram IgA reativa a 230 kDa e 208 kDa, mas não houve diferenças significantes entre si ( $p > 0,08$ ). Também não foi encontrado correlação entre as frequências de resposta (Pearson,  $p > 0,08$ ,  $r < 0,26$ ).

As amostras de colostros testadas e positivas para *S. enteritidis* (n=30), apresentaram 12 bandas diferentes, sendo que, quatro destas, foram detectados em mais de 46% das amostras (Figura 3 e Tabela 2). Duas destas bandas, de 244 e 220 kDa, foram reconhecidas em 53,4% das amostras e foram estatisticamente mais detectadas do que as demais (Tabela 2,

$p < 0,05$ ). Embora as bandas de 176 e 144 kDa, não tiveram diferenças na frequência de detecção dos outros antígenos, em torno de 46% das amostras apresentaram IgA reativos a estas. Houve uma correlação positiva e significativa entre as respostas de IgA positivos entre várias outras bandas (122 vs 244, 208 vs 73, 144 vs 122, 144 vs 55, 135 vs 109, 122 vs 109 e 55 vs 10, Pearson,  $p < 0,03$ ,  $r > 0,38$ ), mas a resposta de IgA às bandas mais detectadas não esteve correlacionada.

Os resultados de IgA contra extratos de *K. pneumoniae* revelou 14 bandas distintas (Figura 3 e Tabela 2). Esta resposta de IgA foi muito variável entre as amostras para esta bactéria e a frequência de resposta positiva contra as bandas mais detectadas, não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Houve diferença entre estas bandas mais detectadas e as de menor peso molecular tais como: 163, 108 e 117 kDa, que foram detectadas em apenas 3 amostras ( $p < 0,05$ ). Houve uma correlação positiva e significativa na frequência de resposta a 202 e 193 kDa (Pearson,  $p = 0,001$ ,  $r = 0,61$ ).

Para os extratos de *E. coli* foram reconhecidas por IgA, 13 bandas diferentes (Figura 3 e Tabela 2). Não houve diferenças na frequência de resposta de IgA a estas bandas ( $p > 0,05$ ). Não houve correlação entre a frequência de resposta às bandas da Tabela 2 (Pearson,  $p > 0,08$ ,  $r < 0,13$ ). No entanto, houve uma correlação positiva e significativa entre as respostas de IgA positivos entre várias outras bandas (247 vs 63, 238 vs 180, 225 vs 216, 207 vs 180, 117 vs 72, Pearson,  $p < 0,03$ ,  $r > 0,38$ ).

#### **5.4. Padrões de resposta das amostra**

Dez padrões diferentes de respostas foram encontrados entre as 48 amostras analisados. O mais comum ( $n = 18$ ; 37,5 %) foi o da presença de anticorpos para todas as bactérias, seguido de amostras que continham anticorpos apenas para *S. aureus* ( $n = 11$ ; 22,9%) e das com positividade para *Salmonella*, *E. coli* e *S. aureus* ( $n = 5$ ; 10,4% ).

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que mais de 62,5% das amostras apresentaram IgAS reativa aos antígenos testados, corroborando com vários estudos que enfatizam a importância do leite materno, como os que evidenciaram proteção contra a infecção por *Haemophilus influenzae* e *Escherichia coli* (Van de Perre, 2003; Hanson, 1998) e infecções entéricas causadas por *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter*, *Shigella spp* e *Giardia lamblia* (Cruz *et al* Glass *et al.*, 1983; Hanson, 1998, 1988; Ruiz- Palacios *et al.*, 1990; Hayani *et al.*, 1992; Walterspiel *et al.*,1994, Barros. 1982).

Cerca de 94% das amostras apresentaram anticorpos IgA reativos contra *S. aureus* que foi acompanhado pela maior complexidade de resposta, pois o número de bandas reativas foram superiores as demais bactérias. Esta alta frequência de IgA reativo, provavelmente se deve ao fato de que esta bactéria ser encontrada em grande quantidade no hospedeiro, fazendo parte da microbiota humana normal de várias regiões do corpo humano, o que não exclui a possibilidade deste micro-organismo causar uma doença em situações de imunossupressão, ou quando as barreiras epiteliais são violadas, que pode ser limitada a superfície da mucosa ou se espalhar por todo o corpo (Nataro e Kaper, 1998).

As razões para a menor ou a maior detecção de anticorpos nas amostras podem estar associadas à estimulação antigênica, a qual a mãe foi exposta anteriormente. Assim o recém-nascido que amamenta pode ser protegido contra um grande número de micro-organismos, inclusive contra os patógenos de seu ambiente (Hanson *et al.*, 1998). Isto ocorre porque os antígenos presentes na mucosa intestinal das mães, através das células M, são apresentadas a placas de Peyer, que fazem parte do tecido linfóide associado ao intestino onde as células B respondem produzindo IgA, junto a cadeia J. O mesmo ocorre na árvore traqueobrônquica Chirico *et al.*, 2008 Estas imunoglobulinas, por estímulo de hormônios lactogênicos, migram para a glândula mamária, onde se ligam ao componente secretor (Hurley *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2005), que a torna mais estável e resistente à digestão péptica (Grassi *et al.*, 2001).

Embora a grande maioria das amostras tenham apresentado IgAS reativos, cerca de 40% das amostras não apresentaram reatividade aos antígenos de *K. pneumoniae*, *S. enteritidis* ou *E. coli*, o que nos permite sugerir que uma parcela da população pode desenvolver infecção por estes micro-organismos, mesmo sendo amamentada. Assim, há necessidade de se avaliar a implantação de medidas estratégicas que visem melhorar a proteção imunológica do recém-nascido no seu período neonatal contra tais micro-organismos. Exposição antigênica, a nível intestinal de mães lactopositivas pode ser importante (Cruz,1988). Esta proteção ocorre, por exemplo, com a imunização pré-natal de mulheres, que receberam dose única de vacina meningocócica, resultando num aumento dos níveis de IgG específico no soro do recém-nascido por 2 a 3 meses após o nascimento, e também dos níveis de IgA específica para o micro-organismo no leite materno, por pelo menos 6 meses (Hurley *et al.*, 2011).

Um estudo de Hurley e colaboradores (2011) detectaram que crianças, mesmo sendo amamentadas, puderam desenvolver diarreia por *Campylobacter* e uma das razões sugeridas pelos autores é devido a ausência de anticorpos específicos contra os antígenos comuns e de virulência de *Campylobacter* nas amostras de colostro materno. Crianças amamentadas q apresentaram diarreia por *E.coli*, tinham baixos níveis de IgA no leite materno. Anticorpos específico do LM não protegeu contra colonização por *Vibrio cholera*, mas nestas em que níveis de IgA anti toxina colérica mais baixa apresentou diarreia (Glass e cols,1983) A queda dos níveis de IgA no leite materno pode desempenhar papel no resultado de infecções entéricas em crianças amamentadas.(Cruz, 1988) O nível de IgA específica varia no tempo e não tem correlação nem com outros anticorpos específico nem com o nível total de IgA.(Cruz, 1988).

Neste sentido, é de suma importância, não somente o estudo da presença de IgAS contra as bactérias, mas também estudo dos antígenos imunodominantes destas espécies na resposta imune natural. A identificação de bandas reativas pode ajudar na investigação dos

antígenos das espécies na resposta imunológica da mucosa. A análise dos resultados mostrou uma grande diversidade de antígenos com predomínio dos de alto peso molecular. As bandas mais frequentes podem estar relacionadas com a ação patogênica e/ou estimulação antigênica destas bactérias, como as de 230 e 289 kDa do *S.aureus* e as quatro bandas mais prevalentes da *S. enteritidis* e da *E. coli* demonstradas na Tabela 2. A *K. pneumoniae* apresentou uma grande variabilidade de resposta de IgA, não mostrando um padrão específico de resposta.

A literatura traz informações a respeito de vários antígenos destas bactérias e que estão envolvidos nas suas capacidades patogênicas, mas pouco se sabe sobre os antígenos de alto peso molecular amplamente reconhecidos pelas amostras do presente estudo. Um antígeno de 94 kDa, denominado de intimina e outros de 70, 80 e 110 kDa envolvidos no processo da lesão “attaching and effacing” pela *E.coli* enteropatogênica foram detectados por IgAS de leite humano (Manjarrez-Hernandez *et al.*, 2000). Também, Rck é uma proteína de membrana externa de 17 kDa, expressa em *E.coli* e *S.enteritidis* que inibe as vias de complemento, impedindo assim a opsonização por esta via (Derek *et al.*,2011). Nenhuma amostra apresentou IgAS reativo a intimina (94 kDa) e a 17 kDa, mas cerca de 38% das amostras responderam a uma banda de peso de 72 kDa, muito próximo da de 70 kDa. Também, 17% das amostras apresentaram IgAS reativo para uma banda de 117 kDa que pode ser a de 110 kDa reportada por Manjarrez-Hernandez e colaboradores (2000).

O antígeno de 106 kDa (que é uma fibronectina do tipo A), é uma das moléculas mais importantes envolvidas nas etapas iniciais de adesão na infecção por *S. aureus* (Zuo *et al.*, 2014). Além destas, proteínas constituintes da membrana de *S. aureus* de 30 e 36 kDa, podem desempenhar um papel importante em infecções causadas por esta bactéria (Akashi *et al.*, 1996). Estes antígenos foram detectados em 17% das amostras com resposta positiva.

Antígenos da *K. pneumoniae* de 35 e 36 kDa induzem anticorpos opsonizante (Alcantar-Curiel *et al.*2000) e foram reconhecidos por 29 % das amostras do presente estudo.

Desta maneira, há necessidade de se entender como, e qual é a qualidade dos anticorpos oferecidos pelo aleitamento materno contra as espécies estudadas, através de estudos mais aprofundados, a fim de se elaborar estratégias que possam prevenir ou diminuir a gravidade de infecções causadas por estas bactérias, especialmente na população brasileira, que tem valores alarmantes de mortes por infecção neonatal por estes micro-organismos. A resposta natural aos extratos bacterianos testados evidenciam um caminho promissor para a elaboração de vacinas contendo antígenos frequentemente detectados e poderiam ser aplicados durante a gestação, aumentando os níveis de IgA específicos no colostro, que poderiam contribuir para a eliminação e controle destes microrganismos no início da vida.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS :

- *S. aureus* e seus antígenos são amplamente reconhecidos por IgA de amostras de colostro;
- Anticorpos IgAS do colostro contra *S. enteritidis*, *E. coli* e *K. pneumoniae* são reconhecidas em aproximadamente 60 % das amostras.
- O número médio de bandas de IgA reativo contra as *enterobacteriaceae* foi estatisticamente menor que o do *S.aureus*, indicando uma menor proteção.
- Os antígenos mais frequentemente detectados foram os de alto peso molecular, apenas *Klebsiella* não apresentou bandas em destaque como as demais bactérias
- Apenas em 37,5% das amostras encontramos alguma IgA reativa a todas as bactérias concomitantemente e 22% respondeu somente a *S.aureus*.

## **9. CONCLUSÃO :**

Assim, estes resultados nos permitem concluir que a presença de IgAS em amostras de colostro foi detectável na maioria das amostras testadas, portanto com indiscutíveis propriedades imunológicas. A ausência de IgAS contra as enterobactérias sugere a necessidade de elaboração de imunoterapias contra estas bactérias envolvidas em infecções neonatais. E que os antígenos de alto peso molecular que estão entre os mais frequentemente detectados poderiam estar envolvidos na patogênese destas bactérias, importante para estudos sobre vacinas.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKASHI, A.; ONO, S.; KUWANO, K.; ARAI, S.; Proteins of 30 and 36 Kilodaltons, Membrane Constituents Of The *Staphylococcus Aureus* Form Induce Production Of Tumor Necrosis Factor Alpha And Activate The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Long Terminal Repeat. **Infection and Immunity**, v. 64, n.8, p.3267-72. Aug, 1996
2. ALCANTAR-CURIEL, M.D.; GARCIA-LATORRE, E.; SANTOS, J.I.; *Klebsiella pneumoniae* 35 e 36 KDa Porins are Common Antigen In Different Serotypes And Induce Opsonizing Antibodies. **Archives of Medical Research**, v. 31, n.1, p. 28-36, Jan-Feb, 2000
3. ARAÚJO, E.D.; GONÇALVES, A.K.; CORNETTA, M.C.; CUNHA, H.; CARDOSO, M.L.; MORAISAND, S.S.; GIRALDO, P. Evaluation of the Secretory Immunoglobulin A Levels in the Colostrum and Milk of Mothers of Term and Pre-Term Newborns. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**; v.9, n. 5, p. 357-362, 2005.
4. ARIFEEEN, S.; BLACK, R.E.; ANTELMAN, G.; BAQUI, A.; CAULFIELD, L; BECKER, S. Exclusive breastfeeding reduces acute respiratory infection and diarrhea deaths among infants in Dhaka Slums. **Journal Pediatrics**. v.108, n. 4, October , 2001.
5. BEREZIN, E.N.; SOLORZANO, F. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. **Journal Infect Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 942-953, Aug 2014
6. BRANDTZAEG, P., Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 222, Aug 2013.
7. CHIRICO, G.; MARZOLLO, R.; CORTINOVIS, S.; FONTE, C.; GASPARONI, A. Antiinfective Properties of Human Milk. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 9, p.1801S-1806S, Sep. 2008.
8. COUTO, R.C.; CARVALHO, E. A. A; PEDROSA, T.M.G.; PEDROSO, E.R.; NETO, M.C.; BISCIONE, F.M. A 10-years prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal intensive care units. **American Journal of Infection Control**, v. 35, p.183-189, April 2007.
9. CRUZ, J.R.; GIL, L.; CANO, F.; CACERES, P.; PAREJA, G. Breast milk anti-Escherichia coli heat labile toxin IgA antibodies protect against toxin-induced infantile diarrhea. **Acta Paediatrica**, v.77, n.5; 1988.

10. DEREK, K.H.; TISSATI, J.; JARVA, H. Functional Recruitment of Human Complement Inhibitor C4b-Binding Protein To Outer Membrane Protein Rck of Salmonella. **PLoS One**, v.6, n.11, e-27546, 2011.
11. DOWNIE L.; ARMIENTO, R.; SUBHI, R.; KELLY, J.; CLIFFORD V.; DUKE T. Community-acquired neonatal and infant sepsis in developing countries: efficacy of WHO's currently recommended antibiotics--systematic review and meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 98, n.2, p.146-54, Feb, 2013.
12. ESCOBAR, A.M.U.; ROCHA, S.S.; SZTAJNBOK, S.; EISENCRAFT, P.; GRISI, J.F.E. Sepsis por *Klebsiella pneumoniae* – Revisão de 28 casos. **Jornal de Pediatria**, v.72, n. 4, p. 230-234, 1996.
13. FERREIRA E.; JOÃO A.; FERRAZ L. Gastroenterite por Salmonella em recém-nascido. **Revista Nascer e crescer**. v. 16, n.3, p. 128-129, 2007.
14. FRANZOLIN, M.R.; ALVES, R.C.B.; KELLER, R.; GOMES, T.A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M.L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz Journal**. v.100, n. 4, July. 2005.
15. FREIJ, B.J.; MCCracken, G.H.J. Acute Infections. In: Avery GB, Fletcher MA, Macdonald MG. editors. Neonatology Pathophysiology and Management of the Newborn. 5th ed. Philadelphia. JB. Lippincott Company. p-1082-1116, 1999.
16. GLASS, R. I.; STOLL, B.J. The protective effect of human milk against diarrhea. **Acta Paediatrica**, Suppl v. 351, p, 131-136, 1989
17. GLASS, R.I.; SVENNERHOLM, A.M.; STOLL, B.J.; KHAN, M.R.; HOSSAIN, K.M.; HUQ, M.I.; HOLMGREN, J. Protection against cholera in breast-fed children by antibodies in breast milk. **The New England Journal of Medicine**. v.308, n. 23, p.1389-92, 1983.
18. GOMES, T.A.T.; GRIFFIN, P.M.; IVEY, C.; TRABULSI, L.R.; RAMOS, S.R.T.S. EPEC infections in São Paulo. **Revista de Microbiologia**. v. 27, p. 25-33, 1996
19. GRASSI, M.S.; COSTA, M.T.Z.; VAZ F.A.C. Fatores Imunológicos do Leite Humano. **Pediatria (São Paulo)**. v. 23, n. 3, p. 258-263, 2001.
20. HANSON, A.L.; ANDERSON, B.; CARISSON, B.; FALLSTROM, S.P.; MELLANDER, L.; PORRAS, O.; SODERSTROM, T.; EDEN, C.S. Protective factors in milk and the development of the immune system, feeding the normal infant. **Pediatrics**, v.71, n.1, p. 172-176, 1985.

21. HANSON, L.A.; ADLERBERTH, I.; CARLSSON, B.; ZAMAN, S.; HAHN-ZORIC, M.; JALIL, F. Antibody-mediated immunity in the neonate. **Padiatrie and Padologie**, v.25, p. 371-376, 1990.
22. HANSON,L.A.; Breastfeeding provides passive and likely long lasting active immunity. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v.81, n.6, p.523-533,1998.
23. HAYANI, K.C.; GUERRERO, M.L.; MORROW, A.L.; GOMEZ, H.F.; WINSOR, D.K.; RUIZ-PALACIOS, G.M.; CLEARY, T.G. Concentration of milk secretory immunoglobulin A against Shigella virulence plasmid-associated antigens as a predictor of symptom status in Shigella-infected breast-fed infants. **The Journal of pediatrics**. v.121, n. 6, p.852-6, 1992
24. HOLTFRETER S.; KOLATA, J.; BROKER, B.M., 2010. Towards the immune proteome of Staphylococcus aureus – the anti-S.aureus antibody response. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p. 176-192, 2010.
25. HURLEY, W.L.; THEIL, P.K. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. **Nutrients**, v.3, n. 4; p. 442–474 ; Apr. 2011.
26. JURSA-KULESZA J.; KORDEK A.; KOPRON K.; WOJCIUK B.; GIEDRYS-KALEMBA S.; Molecular studies of an impetigo bullosa epidemic in full-term infants. **Neonatology**, v.96, n.1, p.61-8, 2009.
27. JYOTHI, P.; METRI C.B.; PEERAPUR V.B. Bacteriological profile of neonatal septicemia and antibiotic susceptibility pattern of the isolates. **Journal of Natural Science Biology and Medicine**, v. 4, n. 2, p. 306–309, Jul-Dec, 2013.
28. MANJARREZ-HERNANDEZ, H.A, S. GAVILANES-PARRA, E. CHAVEZ-BERROCAL, A. NAVARRO-OCAÑA, A. CRAVIOTO. Antigen Detection in Enteropathogenic *Escherichia coli* Using Secretory Immunoglobulin A Antibodies Isolated from Human Breast Milk. **Infection and Immunity**. v. 68, n.9, p. 5030–5036, 2000.
29. MCCRACKEN, G.H.; REGLERO, A.; RODRIGUEZ-APARICIO, L.B.;BERGFELD, A.K. Relation between *Escherichia coli* k1 capsular polysaccharide antigen and Clinical outcome in neonatal meningitis. **The Lancet**, v.304, n. 7875 , p. 246-250, 1974.
30. MONTGOMERY, C.O.; SIEGEL, E.; BLASIER, R.D.; Concurrent septic arthritis and osteomyelitis in children. **Journal Pediatric Orthopaedics**, v. 33, n. 4, p. 464-467, 2013.

31. MUSSI-PINHATA, M.M.; NASCIMENTO, S.D. Infecções Neonatais Hospitalares. **Jornal de Pediatria**, v.77, p. S81-S96, 2001.
32. NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.
33. ORLANDI, P.P.; MAGALHÃES, G.F.; MATOS, N.B.; SILVA, T.; PENATTI, M; NOGUEIRA P.A.; PEREIRA-SILVA, L.H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.39, n.4, p. 507-517, Ribeirão Preto, Apr. 2006.
34. PATEL, A.L.; JOHNSON, T.L.; ENGSTROM, J.L.; FOGG, L.F.; JEGIER, B.J.; BIGGER, H.R. Impact of early human milk on sepsis and health care costs in very low birth weight infants. **Journal of Perinatology**, v. 33, n. 7, p. 514-519, July, 2013.
35. PETRECHEN, L. N.; ZAGO, F. H.; SESSO, M. L. T.; BERTOLDO, B. B.; SILVA, C. B.; AZEVEDO, K. P.; LIMA PEREIRA, S. A.; GERALDO-MARTINS, V. R.; FERRIANI, V. P. L.; NOGUEIRA, R. D. Levels and complexity of IgA antibody against oral bacteria in samples of human colostrums. **Immunobiology**, v. 220, p-142-146, 2015
36. RUIZ-PALACIOS, G.M.; CALVA, J.J.; PICKERING, L.K.; LOPEZ-VIDAL, Y.; VOLKOW, P.; PEZZAROSSO, H.; WEST, M.S. Protection of breast-fed infants against Campylobacter diarrhea by antibodies in human milk. **The Journal of pediatrics**. v.116, n. 5, p.707-13, 1990.
37. RUPULO, B.S.; MIRAJ, G.S.; KANTOR JUNIOR, O. Deficiência de IgA. **Jornal de Pediatria**, v.74, n. 6, p. 438-440, 1998.
38. SILVA, A.R.A. ; SIMÕES M.L.C.L; WERNECK L.S.; TEIXEIRA C.H. Infecções relacionadas à assistência à saúde por Staphylococcus coagulase negativa em unidade de terapia intensiva neonatal. **Revista Brasileira De Terapia Intensiva, São Paulo** , v. 25, n .3, pp. 239-244, 2013.
39. SILVEIRA, R.C.; GIACOMINI, C.; PROCIANOY, R.S.; Sepsis e choque séptico no período neonatal: atualização e revisão de conceitos **Revista Brasileira de Terapia Intensiva.**; v.22, n. 3, p.280-290, 2010.
40. TOMICIC, S.; JOHANSSON, G.; VOOR, T.; BJÖRKSTÉN, B.; BÖTTCHER, M.F.; JENMALM, M.C. Breast milk cytokine and IgA composition differ in Estonian and Swedish mothers-relationship to microbial pressure and infant allergy. **Pediatric Research**. v.68, nº. 4, p.330-4, 2010

41. VAN DE PERRE P. Transfer of antibody via mother's milk. **Vaccine**. 28;21(24):3374-3376. ; Jul 2003
42. VIJAYAKANTHI N.; BAHL D., KAUR N., MARIA A., DUBEY N.K.. ;Frequency and characteristics of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing. **Biomed Research International**. v.2013; 2013
43. WALTERSPIEL, J.N.; MORROW, A.L.; GUERRERO, M.L.; RUIZ-PALACIOS, G.M.; PICKERING, L.K. Secretory anti-Giardia lamblia antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. **Pediatrics**. v.93, n. 1, p.28-31, 1994.
44. WHO- [http://www.who.int/gho/child\\_health/mortality/mortality\\_under\\_five\\_text/en](http://www.who.int/gho/child_health/mortality/mortality_under_five_text/en)
45. YOON, P.W.; BLACK R.E.; MOULTON, L.H.; BECKER, S. Effect of not breastfeeding on the risk of diarrheal and respiratory mortality in children under 2 years of age in Metro Cebu, Philippines. **American Journal of Epidemiology**. v.143, p.142-148, 1996.
46. ZAIDI, J.M.; PONCE D.L.R.; VAZQUEZ-NARVAEZ G.; CHABLE- MENDOZA C. Prospective study of nasocomial infections at a pediatrics unit. **Boletin Medico del Hospital Infantil de Mexico**. v. 48, p.538-543, 1991.
47. ZUO, Q.F.; CAI, C.Z.; WU Y.; FENG Q.; YANG, H.J.; WEI, Z.B.; ZENG, H. Identification of the immunodominant regions of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein A. **PLoS One**. v.9, n.4, e95338, Apr. 2014.

## 11. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE UBERABA -  
UNIUBE



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS IgA EM AMOSTRAS DE LEITE MATERNO CONTRA BACTÉRIAS ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES NEONATAIS DE RECÉM NASCIDOS.

**Pesquisador:** Ruchele Dias Nogueira

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 02166713.4.0000.5145

**Instituição Proponente:** Universidade de Uberaba - UNIUBE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 257.358

**Data da Relatoria:** 26/04/2013

**Apresentação do Projeto:**

O projeto intitulado: ANÁLISE DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS IgA EM AMOSTRAS DE LEITE MATERNO CONTRA BACTÉRIAS ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES NEONATAIS DE RECÉM NASCIDOS tem como proposta principal avaliar os níveis de anticorpos IgA e suas especificidades aos antígenos de bactérias comumente envolvidas nas infecções bacterianas de neonatos, como bactérias gram negativas como Escherichia coli, Salmonella spp e Klebsiella pneumoniae. Este projeto faz parte de um amplo estudo intitulado INFLUÊNCIA MATERNA NO DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA

IMUNOLÓGICA DE MUCOSA CONTRA PATÓGENOS ORAIS NO INÍCIO DA VIDA a respeito da avaliação da resposta imune adaptativa frente ao desafio microbiano oral no início da vida e da análise da influência de fatores maternos (colonização microbiana e resposta imune) durante e após a gestação. Neste projeto será realizada uma avaliação do leite materno quanto aos níveis e especificidade de anticorpos transferidos para o feto via amamentação contra espécies envolvidas nas causas de morte no início da vida, na tentativa de elucidar a proteção imune adaptativa conferida pela mãe através do aleitamento materno.

De acordo com a metodologia, participará do estudo 50 puérperas no Centro de Referência da Saúde da Mulher de Ribeirão Preto Mater que fizeram parte de um amplo estudo sobre anticorpos e bactérias orais. Nas amostras de leite congelado serão analisados os níveis e complexidade de resposta de anticorpos IgA através de ensaios de western blot.

**Endereço:** Av.Nene Sabino, 1801

**Bairro:** Universitário

**CEP:** 38.055-500

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3319-8959

**Fax:** (34)3314-8910

**E-mail:** cep@uniube.br

Critérios de inclusão: Mães que deram entrada para realização do parto no Centro de Referência da Saúde da Mulher de Ribeirão Preto - Mater e que concordaram em participar do estudo prévio e assinaram o termo de consentimento. As coletas foram realizadas no primeiro dia pós-parto e também responderam a um questionário de saúde geral da mãe e do recém-nascido.

Critérios de exclusão: Foram excluídas as mães que apresentassem: (1) má saúde geral, (2) alguma intercorrência durante o parto; (3) uso de medicamentos como antibióticos e corticoides.

As variações dos níveis de imunoglobulinas serão analisadas através da análise de correlação de Pearson e teste de variância não paramétrico. Os padrões de complexidade de resposta imune verificado nos ensaios de western blot também serão quantificados através do número de antígenos distintos identificados das diferentes espécies bacterianas testadas e das intensidades das reações medidas através da densitometria das bandas reconhecidas e correlacionados entre eles e entre as amostras.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar os níveis de anticorpos IgA e suas especificidades aos antígenos de bactérias comumente envolvidas nas infecções bacterianas de neonatos, como por exemplo: gram negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e *Klebsiella pneumoniae*.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os benefícios superam os riscos, haja visto que as coletas já foram realizadas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante. Espera-se com esta pesquisa reafirmar a importância do aleitamento materno na proteção imunológica do neonato.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) encontra-se escrito de forma clara e adequada.

**Recomendações:**

Recomenda-se revisar a redação do TCLE corrigindo expressões como:

"Este projeto se justifica a necessidade " e termos como "sepsemia"

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Av.Nene Sabino, 1801

**Bairro:** Universitário

**CEP:** 38.055-500

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3319-8959

**Fax:** (34)3314-8910

**E-mail:** cep@uniube.br

UNIVERSIDADE DE UBERABA -   
UNIUBE

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em reunião do dia 26 de abril de 2013 a plenária decidiu pela aprovação do projeto.

UBERABA, 26 de Abril de 2013

---

**Assinador por:**  
**Geraldo Thedei Junior**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av.Nene Sabino, 1801

**Bairro:** Universitário

**CEP:** 38.055-500

**UF:** MG

**Município:** UBERABA

**Telefone:** (34)3319-8959

**Fax:** (34)3314-8910

**E-mail:** cep@uniube.br

Anexo 2



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br



Ribeirão Preto, 16 de março de 2011

Ofício nº 850/2011  
CEP/MGV

**Prezadas Senhoras,**

O trabalho intitulado **“INFLUÊNCIA MATERNA NO DESENVOLVIMENTO E NA ATIVIDADE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE MUCOSA CONTRA PATÓGENOS ORAIS NO INÍCIO DA VIDA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 319ª Reunião Ordinária realizada em 14/03/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 13290/2010.

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.*

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

  
**DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras  
**RUCHELE DIAS NOGUEIRA**  
**PROFª. DRª. VIRGÍNIA PAES LEME FERRIANI(Supervisora)**  
Depto. de Puericultura e Pediatria