ANA LÚCIA SILVEIRA LESSA MARQUES

**AQUISIÇÃO PASSIVA DE ANTICORPOS IgG
MATERNOS REATIVOS COM OS
LIPOPOLISSACARÍDEOS DE ENTEROBACTÉRIAS
INCIDENTES EM INFECÇÕES NEONATAIS POR
RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMOS E A TERMO**

São Paulo

2009

ANA LÚCIA SILVEIRA LESSA MARQUES

**AQUISICÃO PASSIVA DE ANTICORPOS IgG
MATERNOS REATIVOS COM OS
LIPOPOLISSACARÍDEOS DE
ENTEROBACTÉRIAS INCIDENTES EM
INFECÇÕES NEONATAIS POR RECÉM-
NASCIDOS PRÉ-TERMOS E A TERMO**

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas.**

Área de concentração: Parasitologia

**Orientador: Profa. Dra. Magda Maria
Sales Carneiro- Sampaio**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Marques, Ana Lúcia Silveira Lessa.

Aquisição passiva de anticorpos IgG maternos reativos com os lipopolissacarídeos de enterobactérias incidentes em infecções neonatais por recém-nascidos pré-termos e a termo / Ana Lúcia Silveira Lessa Marques. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Magda Maria Sales Carneiro Sampaio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Passagem transplacentária de anticorpos.

Versão do título para o inglês: Passive acquisition of maternal IgG antibodies reactive to lipopolysaccharide from enterobacteria incident in neonatal infections by preterm and term neonates.

Descritores: 1. Lipopolissacarídeo 2. Enterobactérias 3. Transferência transplacentária 4. Anticorpos IgG 5. Recém-nascido a termo 6. Recém-nascido pré-termo I. Carneiro-Sampaio, Magda Maria Sales II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. III. Título.

ICB/SBIB227/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Lúcia Silveira Lessa Marques.

Título da Dissertação: Aquisição passiva de anticorpos IgG maternos reativos com os lipopolissacarídeos de enterobactérias incidentes em infecções neonatais por recém-nascidos pré-termos e a termo.

Orientador(a): Magda Maria Sales Carneiro Sampaio.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

São Paulo

2009

À DEUS a força criadora do universo...

.... aos meus amados PAIS Edson e Célia que me acolhem e AMAM de forma tão especial em suas VIDAS...

Ao meu AMADO Otávio que busca comigo realizar os NOSSOS SONHOS mais DESEJADOS...

A pequena vovó Francisca que é GRANDIOSA no seu apoio e incentivo...

ÀS duas bonequinhas Fernanda e Maria Fernanda por AMÁ-LAS ...

Aos meus sogros SuSu e Paulo pelo INCENTIVO e apoio .

ESTAMOS juntos e esperançosos pelas nossas eternas

Conquistas ...

À Dra. Patrícia Palmeira pela oportunidade de aprender mais ...

*muito mais ... quando se tem **HUMILDADE** para ensinar e **AMIZADE**.*

À Profa. Dra. Magda M. S. Carneiro-Sampaio por

*permitido a transformação de um **SONHO** em*

***REALIDADE**.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora pela confiança, compreensão, apoio, incentivo e ensinamentos;

Às amigas e companheiras de laboratório Elaine Cristina Cardoso, Rosana Rezende de Oliveira, Mariana Acenjo Kmiliauskis, Simone Corrêa da Silva, Cristina Arslanian Kubo, Camila Quinello, Fabiana Ghilardi, Gerlândia Neres Pontes, Denise Amazonas, Flávia Lima e Leuridan Torres;

À Dra. Vera Jornada Krebs pela parceria no projeto, disponibilidade e atenção nas análises dos prontuários das parturientes;

À Dra. Tatiana Brasil que realizou as preciosas coletas do nosso trabalho de mestrado;

À Dra. Renata de A. Monteiro pela disponibilidade pelas coletas finais do trabalho;

À Jéssica dos Santos pelo auxílio e atenção nas consultas dos prontuários das pacientes;

Ao Prof. Dr. Antônio Condino Neto pelo acolhimento e aos seus alunos e colegas com os quais compartilhei todos os momentos do Mestrado, Josias Brito Frazão, Paulo Vitor Soeiro Pereira, Walmir Cutrin Aragão Filho, Angela Falcai, Patrícia Macchiaverni e a querida Silvana Lucchini;

À Dra. Dora Lisa Friedlander Del Nero pelas amostras cedidas como também a atenção carinhosa na interpretação dos dados clínicos desta dissertação;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro;

À estatística Rosana D. Prisco pelo carinho e atenção na elaboração das análises estatísticas deste trabalho;

Aos professores Marcelo Urbano Ferreira, Solange Barros Carbonare e Tânia Gomes Tardelli do Amaral que contribuíram de forma muito construtiva para o melhor desenvolvimento do nosso trabalho por ocasião do Exame de Qualificação;

As secretárias da pós-graduação do Departamento de Parasitologia Wilma Garcia de Souza e Ângela Maria Casemiro de Jesus pela constante ajuda neste período do mestrado.

RESUMO

Marques ALSL. Aquisição passiva de anticorpos IgG maternos reativos com os lipopolissacarídeos de enterobactérias incidentes em infecções neonatais por recém-nascidos pré-termos e a termo [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Infecções bacterianas neonatais estão estimadas em 1,6 milhões de mortes anuais ou 40% da totalidade dos óbitos neonatais nos países em desenvolvimento. Uma grande incidência de bactérias gram-negativas, especificamente das espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, são responsáveis por infecções neonatais adquiridas em hospitais. A endotoxina ou lipopolissacárideo (LPS), um constituinte da membrana externa dessas bactérias, é o principal indutor de respostas inflamatórias em seres humanos. Transferência placentária de anticorpos IgG é um importante mecanismo que fornece proteção para o recém-nascido, enquanto a resposta humoral é ineficiente, e contribui para a maturação do sistema imunológico. Este mecanismo resulta em níveis séricos de IgG neonatal equivalentes aos níveis maternos, e com os mesmos padrões de reconhecimento antigênico. O aumento da susceptibilidade a infecções sistêmicas no recém-nascido tem sido atribuído à falta de anticorpos maternos transferidos reativos contra endotoxinas. Esta hipótese é amparada pela idéia de que o anticorpo produzido é principalmente do isotipo IgM. No entanto, a presença de anticorpos IgG contra LPS em soro de cordão umbilical já foi demonstrada. Estes anticorpos foram semelhantes aos encontrados nos respectivos soros maternos, tanto no que se refere ao padrão de reconhecimento, quanto à quantidade. Os objetivos foram avaliar a transferência placentária de IgG reativa ao LPS presente em *K. pneumoniae*, *E. coli* O111, O26 e O6 e em *Pseudomonas aeruginosa*; analisar anticorpos IgM totais e específicos nos soros maternos e;

investigar a influência das patologias apresentadas por algumas mães na transferência placentária. Foram avaliados 29 pares de soro materno e soro de cordão de recém-nascidos pré-termos e 32 pares de soro materno e soro de cordão de recém-nascidos a termo. Anticorpos IgG séricos totais foram avaliados nas amostras de soro das mães e de seus recém-nascidos, e anticorpos IgM séricos totais foram dosados apenas nas amostras maternas por imunodifusão radial. O teste de ELISA foi realizado para detectar anticorpos IgG e IgM anti-LPS. Foram verificadas concentrações reduzidas de IgG total em neonatos pré-termos, como esperado, mas as taxas de transferência placentária de IgG total e anti-LPS foram sistematicamente reduzidas, quando comparadas aos neonatos a termo. Uma boa correlação inversa foi encontrada entre os níveis de IgG maternos e as taxas de transferência placentária indicando que, quanto menores os níveis totais e específicos de IgG maternos, maiores são as taxas de transferência placentária destes anticorpos. Os níveis de IgM total e anti-LPS foram equivalentes em ambos os grupos de mães. As patologias das mães influenciaram somente os níveis de IgM no grupo de mães de pré-termos. Níveis de IgG parecem ser influenciados apenas pela condição de prematuridade, uma vez que diferenças nos níveis de IgG entre recém-nascidos pré-termos e a termo foram encontradas em ambos os grupos, com e sem patologias. Em conclusão, como esperado, foi observada uma aquisição defeituosa de anticorpos IgG reativos com os LPS de enterobactérias associadas com infecções neonatais por recém-nascidos pré-termos, o que os predispõe a um maior risco de infecções hospitalares.

Palavras-chave: Transferência placentária; Lipopolissacarídeo; Enterobactérias; Recém-nascidos pré-termos e a termo; Anticorpos IgG.

ABSTRACT

Marques ALSL. Passive acquisition of maternal IgG antibodies reactive with lipopolysaccharide from enterobacteria incident in neonatal infections by preterm and term neonates [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Bacterial neonatal infections are estimated to cause 1.6 million annual deaths or 40% of all of the neonatal deaths in the developing countries. A great incidence of Gram-negative bacteria, specifically of the *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* species are responsible for acquired neonatal nosocomial infections. The endotoxin or lipopolysaccharide (LPS), a constituent of the outer membrane of these bacteria, is the major inducer of inflammatory responses in humans. Placental transfer of IgG antibodies is an important mechanism that provides protection to the newborn while the humoral response is inefficient, and contributes to the maturation of the immune system. It results in newborn IgG serum levels equivalent to the mothers' levels, and with the same antigenic recognition patterns. Increased susceptibility to systemic infections in the newborn infant has been attributed to the lack of maternally transferred antibodies reactive with endotoxins. This hypothesis is supported by the idea that the antibody source is provided mainly by the IgM isotype. However, the presence of IgG antibodies against LPS in cord blood sera has already been demonstrated. These antibodies were similar to those found in the respective maternal serum samples as regards both pattern of recognition and quantity. The aims were to evaluate the placental transfer of IgG reactive to LPS present in *K. pneumoniae*, in *E. coli* O111, O26 and O6 and in *P. aeruginosa*; to analyze total and specific IgM antibodies on the mother's sera and; to investigate the influence

of the pathologies presented by some mothers in the placental transfer. We evaluated 29 paired maternal and cord sera from preterm newborns and 32 paired maternal and cord sera from term newborns. Total IgG levels were evaluated in both mother and newborn serum samples, and total IgM levels were dosed only in the maternal sera, by radial immunodiffusion. ELISA was performed to detect anti-LPS IgG and IgM antibodies. It was verified reduced total IgG concentrations in preterm neonates as expected, but placental transfer ratios of total and anti-LPS IgG were systematically reduced when compared with term neonates. Good inverse correlation indexes between maternal IgG levels and placental transfer ratios were found, indicating the lower is total and specific IgG maternal levels the higher is placental transfer ratios. Total and anti-LPS IgM levels were equivalent on mothers of both groups. The mothers' pathologies influenced only the IgM levels in the preterm mother's group. IgG levels seemed to be influenced only by the prematurity condition, since differences in IgG levels between term and preterm neonates were found in both groups, with and without pathologies. In conclusion, as expected, it was verified a defective acquisition of IgG antibodies reactive with enterobacterial LPS associated with neonatal infections by preterm neonates, which will predispose them to an increased risk of nosocomial infections.

Key words: Placental transfer; Lipopolysaccharide; Enterobacteria; Term and preterm newborns; IgG antibodies.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	“American Tissue Cell Collection”
CMV	Citomegalovírus
D.O.	Densidade ótica
DUM	Data da última menstruação
EAggEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
Fc	Fragmento cristalizável
FcRn	Receptor Fc neonatal
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HUS	Síndrome urêmica hemolítica
CMV	Citomegalovírus
D.O.	Densidade ótica
IDRQ	Imunodifusão radial quantitativa
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Kilodalton
LBP	Proteína ligante de LPS
LPS	Lipopolissacarídeo
NF-κB	Fator nuclear κB
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PT	Pré-termo
RN	Recém-nascido
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
T	Termo
TD	Timo-dependente

TI	Timo-independente
TLR	Toll-like receptor

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01.	O sinciciotrofoblasto internalizando IgG materna	25
Figura 02.	Desenho esquemático da parede celular de bactérias Gram-negativas	30
Figura 03.	Número de recém-nascidos pré-termos e a termo e suas respectivas idades gestacionais	47
Figura 04.	Concentrações séricas de IgG total (mg/dl) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG total (%) (eixo Y direito) nos três grupos	50
Figura 05.	Concentrações séricas de IgG anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG anti-LPS de <i>Klebsiella</i> (%) (eixo Y direito) nos três grupos	52
Figura 06.	Concentrações séricas de IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O6 ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O6 (%) (eixo Y direito) nos três grupos	54
Figura 07.	Concentrações séricas de IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O111 ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG anti-LPS <i>E. coli</i> O111 (%) (eixo Y direito) nos três grupos	56
Figura 08.	Concentrações séricas de IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O26 ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O26 (%) (eixo Y direito) nos três grupos	58
Figura 09.	Concentrações séricas de IgG anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG anti-LPS de <i>Pseudomonas</i> (%) (eixo Y direito) nos três grupos	60
Figura 10.	Concentrações séricas de IgM total (mg/dl) em amostras de soro materno dos grupos de recém-nascidos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo	62

Figura 11.	Concentrações séricas de IgM anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , anti-LPS de <i>E. coli</i> O6, O111 e O26 e anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (µg/ml) em amostras de soro materno do grupo de recém-nascidos pré-termos com idade gestacional ≤ 33 semanas, > 33 semanas e a termo	67
Figura 12.	Concentrações de anticorpos IgM totais (mg/dl) (eixo Y direito) e anticorpos IgM anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , anti-LPS de <i>E. coli</i> O111 e O26 e anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (µg/ml) (eixo Y esquerdo) em amostras de soro das mães de recém-nascidos pré-termos com e sem patologias	70
Figura 13.	Concentrações de anticorpos IgG totais (mg/dl) (eixo Y esquerdo) e anticorpos IgG anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , anti-LPS de <i>E. coli</i> O6, O111 e O26 e anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (µg/ml) (eixo Y direito) em amostras de soro de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termos e a termo do subgrupo sem patologias	72
Figura 14.	Taxas de transferência de anticorpos IgG totais e específicos para o LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , de <i>E. coli</i> O6, O111 e O26 e de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%) em amostras de soro de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termos e a termo do subgrupo sem patologias	73
Figura 15.	Concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de <i>E. coli</i> O111 e O26 e anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (µg/ml) em amostras de soro das mães de recém-nascidos pré-termos e a termo sem patologias	75
Figura 16.	Concentrações de anticorpos IgG totais (mg/dl) (eixo Y esquerdo) e anticorpos IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O26 e de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (µg/ml) (eixo Y direito) em amostras de soro de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termos e a termo do subgrupo com patologias	77
Figura 17	Taxas de transferência de anticorpos IgG totais e específicos para LPS de <i>E. coli</i> O26 e para LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%) em amostras de soro de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termos e a termo do subgrupo com patologias	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Número de amostras de recém-nascidos pré-termos e a termo com suas respectivas idades gestacionais representadas em semanas	48
Tabela 02.	Análise estatística descritiva das concentrações de IgG sérica total (mg/dl) e das taxas de transferência de IgG total (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo	49
Tabela 03.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ($\mu\text{g/ml}$) e das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo	51
Tabela 04.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O6 ($\mu\text{g/ml}$) e das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo	53
Tabela 05.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O111 ($\mu\text{g/ml}$) e das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo	55
Tabela 06.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O26 ($\mu\text{g/ml}$) e das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo	57
Tabela 07.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ($\mu\text{g/ml}$) e das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo	59
Tabela 08.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM séricos totais em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo	61
Tabela 09.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo	62

Tabela 10.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de <i>E. coli</i> O6 em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo	64
Tabela 11.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de <i>E. coli</i> O111 em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo	65
Tabela 12.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de <i>E. coli</i> O26 em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo	66
Tabela 13.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo	67
Tabela 14.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM totais (mg/dl) e específicos ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro das mães de recém-nascidos pré-termos com e sem patologias	69
Tabela 15.	Análise estatística descritiva das concentrações séricas de IgG total (mg/dl) e IgG anti-LPS ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro de recém-nascidos a termo e pré-termos do subgrupo sem patologias	72
Tabela 16.	Análise estatística descritiva das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro de recém-nascidos a termo e pré-termos do subgrupo sem patologias	73
Tabela 17.	Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de O111, O26 e de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro das mães de recém-nascidos a termo e pré-termos do subgrupo sem patologias	74
Tabela 18.	Análise estatística descritiva das concentrações séricas de IgG total (mg/dl) e IgG anti-LPS ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro de recém-nascidos a termo e pré-termos do subgrupo com patologias	76
Tabela 19.	Análise estatística descritiva das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro de recém-nascidos a termo e pré-termos do subgrupo com patologias	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Ontogenia de células B e resposta de anticorpos no feto e recém-nascido	23
1.2	Transporte transplacentário de imunoglobulinas	24
1.3	Prematuridade e o transporte de imunoglobulinas	27
1.4	Lipopolissacarídeo e repercussão no sistema imune	30
1.5	Epidemiologia das infecções neonatais	32
2	OBJETIVOS	40
2.1	Objetivos específicos	40
2.2	Objetivo geral	40
3	METODOLOGIA	41
3.1	Casuística	41
3.2	Antígenos Utilizados	43
3.3	MÉTODOS	44
3.3.1	Dosagem de IgG e IgM total por imunodifusão radial quantitativa (IDRQ)	44
3.3.2	Dosagem de anticorpos IgM e IgG reativos com os diferentes LPS por método imunoenzimático (ELISA)	45
3.3.2A	Padronização do método imunoenzimático para determinação de anticorpos IgM e IgG anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e anti-LPS de <i>E. coli</i> O6, O111, O26 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
3.3.2B	Método imunoenzimático	46
3.3	Análise Estatística	48
4	RESULTADOS	49

4.1	Grupo Amostral	49
4.2	Concentrações séricas de IgG total	50
4.3	Dosagem de Anticorpos IgG Específicos	53
4.3.1	Concentrações de IgG anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	53
4.3.2	Concentrações de IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O6	55
4.3.3	Concentrações de IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O111	57
4.3.4	Concentrações de IgG anti-LPS de <i>E. coli</i> O26	59
4.3.5	Concentrações de IgG anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
4.4	Concentrações totais de IgM sérica	61
4.5	Dosagem de Anticorpos IgM Específicos	64
4.5	Concentrações de IgM anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	64
4.5.2	Concentrações de IgM anti-LPS de <i>E. coli</i> O6	65
4.5.3	Concentrações de IgM anti-LPS de <i>E. coli</i> O111	66
4.5.4	Concentrações de IgM anti-LPS de <i>E. coli</i> O26	67
4.5.5	4.5.5 Concentrações de IgM anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
4.6	Análise do Efeito das Patologias Sobre os Níveis de Anticorpos Maternos, Neonatais e Taxas de Transferência	71
4.6.1	Comparação das concentrações de anticorpos entre mães COM E SEM PATOLOGIAS do grupo de PRÉ-TERMOS	71
4.6.2	Comparação das concentrações de anticorpos entre mães COM E SEM PATOLOGIAS do grupo de TERMO	73
4.6.3	Análise das concentrações de anticorpos entre os grupos	74

TERMO E PRÉ-TERMO de mães SEM PATOLOGIAS

4.6.4	Análise das concentrações de anticorpos entre os grupos	78
	TERMO E PRÉ-TERMO de mães COM PATOLOGIAS	

5	DISCUSSÃO	82
----------	------------------	-----------

6	CONCLUSÃO	
----------	------------------	--

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 INTRODUÇÃO

A proteção do recém-nascido (RN) contra infecções inicia-se na vida intra-uterina, onde o líquido amniótico constitui-se em barreira muito eficiente devido à presença de diversos fatores de defesa. Estes fatores incluem proteínas de fase aguda, como CD14 solúvel e LBP (proteína ligante de LPS), que modulam a atividade endotóxica do LPS, assim como peptídeos e proteínas antimicrobianas como lactoferrinas, histonas e defensinas. A atividade antibacteriana do líquido amniótico pode inibir o crescimento de algumas bactérias, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Klebsiella*, *Enterobacter spp* e fungos, como *Candida albicans*. O trabalho de parto prematuro promove um aumento nas concentrações de fosfolipase A2 no fluido amniótico, que possui uma atividade antimicrobiana *in vitro* contra múltiplas espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas (Levy, 2007; Ceccon, et al., 1997).

A cavidade uterina, portanto, contém mecanismos inatos de detecção e mecanismos efetores que mantêm a esterilidade, detectam infecções e, sob condições de invasão microbiana intensa, induzem a expressão de mediadores que aceleram a maturação do pulmão e do parto, com o intuito de liberar o feto para um ambiente aonde possa ser tratado.

O recém-nascido, sobretudo o prematuro, é extremamente suscetível a infecções por um grande número de microrganismos (Maródi, 2006). Recém-nascidos prematuros e/ou com baixo peso ao nascimento e aqueles nascidos de mães com determinadas condições clínicas, que possam vir a alterar a dinâmica de passagem de anticorpos pela placenta, apresentam um risco ainda maior de infecção devido à baixa aquisição de anticorpos protetores maternos, por apresentar um sistema imune inato ainda menos desenvolvido e a pele, uma importante barreira física, mais frágil e que pode ser facilmente danificada. Portanto, o baixo peso ao nascimento é um dos principais fatores associados à morbimortalidade perinatal (Mussi-Pinhata e Rego, 2005).

1.1 Ontogenia de células B e resposta de anticorpos no feto e recém-nascido

A maturação da resposta imunológica específica no feto começa na vida intra-uterina entre a 8^a e 12^a semanas de gestação, alcançando sua maturação plena somente na adolescência (Carneiro-Sampaio, 1992).

Células pré-B são primeiramente detectadas no fígado fetal, a partir da 8^a semana de gestação e na medula óssea, a partir da 13^a semana. Na metade da gestação, a medula óssea é o sítio predominante de desenvolvimento de células pré-B, e após 30 semanas de gestação e pelo resto da vida, a linfopoese de células B ocorre somente na medula óssea. Células B expressando IgM na superfície podem ser encontradas em torno da 10^a semana, porém sem a expressão concomitante de IgD. Este fenótipo IgM⁺IgD⁻ constitui um estágio transitório entre células pré-B e células B maduras IgM⁺IgD⁺ (Kohler e Farr, 1966; Gathings, et al., 1977) e neste estágio, a exposição a antígenos no útero induz tolerância, e contribui com a observação de que infecções congênitas precoces, algumas vezes, resultam em defeitos na produção de imunoglobulinas específicas para o patógeno.

Por volta da 16^a semana de gestação, células B fetais com todos os isotipos de cadeia pesada são detectáveis na medula óssea, no entanto não é conhecido o estímulo para o switch de classes nesse período. Centros germinativos no baço e linfonodos são ausentes durante a vida fetal, mas aparecem durante os primeiros meses após estimulação antigênica pós-natal. A falta dessas estruturas provavelmente contribui significativamente com a imunodeficiência dos neonatos (Marshall-Clarke, et al., 2000).

Durante os primeiros meses de vida, as células B periféricas maduras expressam menor quantidade da molécula co-estimulatória CD40, assim como as células T também apresentam menor quantidade do ligante de

CD40 (CD40L ou CD154). Este fato poderia explicar a baixa produção de isotipos IgA, IgG e IgE nesse período da vida (Bona e Bot, 1997).

A resposta humoral neonatal tem seu início demorado, tendo um baixo pico de resposta e de pequena duração, com níveis de IgG2 mais baixos nos neonatos quando comparados aos adultos e com uma afinidade e heterogeneidade reduzidas. Tanto o feto, como o RN são capazes de produzir anticorpos do tipo IgM, mas em níveis inferiores aos de adultos. Estes baixos níveis de anticorpos são produzidos por células B-1 CD5⁺ e representam anticorpos IgM naturais produzidos na ausência de estímulo antigênico, e que podem ser importantes na defesa inata contra infecções, atuando até que a resposta de células B antígeno-específicas se desenvolva. No entanto, níveis elevados de IgM (maiores que 20 mg/dl) em soro de cordão umbilical sugerem possível infecção intra-uterina.

No que diz respeito à resposta de anticorpos, o neonato é incapaz de responder a determinados antígenos, particularmente para polissacarídeos capsulares bacterianos, o que pode refletir uma limitação intrínseca da função de células B ou uma deficiência no microambiente anatômico requerido para a sua ativação e diferenciação em células plasmáticas (Lewis e Wilson, 2006).

1.2 Transporte transplacentário de imunoglobulinas

A passagem transplacentária de imunoglobulinas da mãe para o feto confere ao neonato a proteção temporária contra antígenos com os quais a mãe foi exposta. Ao mesmo tempo, à medida que é exposto aos diversos antígenos, o RN passa a desenvolver o seu próprio repertório concomitantemente com a queda dos níveis de imunoglobulinas adquiridas da mãe.

As imunoglobulinas do feto consistem quase totalmente de IgG materna transferida através da placenta por meio de um mecanismo

mediado por receptor específico (Saji, et al., 1996). Este mecanismo, embora não esteja completamente esclarecido, claramente depende da ligação da porção Fc da IgG materna a receptores específicos no sinciciotrofoblasto placentário denominados receptores Fc neonatais (FcRn) (Simister, et al., 1996; Saji, et al., 1999; Lewis e Wilson, 2006).

Para atingir a circulação fetal, a molécula de IgG materna precisa ultrapassar, pelo menos, duas barreiras: o sinciciotrofoblasto e o endotélio capilar fetal. Em algumas regiões da placenta a termo, estas duas estruturas estão separadas somente pela lâmina basal; em outras, células do estroma viloso e alguns citotrofoblastos estão também presentes (Bernirschke e Kaufmann, 1995).

O sinciciotrofoblasto é banhado por sangue materno e internaliza o soro materno contendo IgG. As moléculas de IgG penetram no sinciciotrofoblasto por pinocitose e se ligam a receptores FcRn presentes na superfície celular que sofrem processo de invaginação, acabando por recobrir a superfície interna do endossomo. O FcRn liga-se com alta afinidade à porção Fc da IgG materna quando em pH ácido, o que permite a proteção das moléculas de IgG contra a ação de enzimas lisossomais. Após a transcitose através das células epiteliais, o endossomo se funde à lâmina basal trofoblástica, na face fetal do sinciciotrofoblasto, e a IgG materna é liberada do receptor pela ação do pH fisiológico e ganha acesso ao endotélio fetal, e assim, a circulação fetal (Roopenian, et al., 2007).

Figura 1: O sincitiotrofoblasto internaliza o fluido contendo IgG materna formando um endossomo, o qual é gradualmente acidificado promovendo a ligação da IgG com o receptor FcRn presente na face interna deste compartimento. Através de transcitose, a vesícula se funde a membrana na face fetal do sincitiotrofoblasto onde o pH fisiológico fetal promove a dissociação da IgG com o FcRn.

Fonte: Adaptado de Roopenian et al., 2007.

O transporte de IgG da mãe para o feto começa em torno da 12^a semana de gestação, sendo que entre a 8^a e 10^a semanas, uma concentração muito pequena de IgG no estroma viloso da placenta é encontrada.

A concentração de IgG permanece baixa até o segundo trimestre. Segundo Malek e colaboradores (1996) observa-se um aumento na média das concentrações fetais de IgG entre a 17^a e 22^a semanas de gestação (aproximadamente 10% da concentração materna) e entre a 28^a e 32^a semanas (aproximadamente 50% da concentração materna), sendo que os níveis fetais de IgG continuam aumentando durante o terceiro trimestre. A taxa de aumento de IgG fetal entre a 29^a e 41^a semanas de gestação dobra quando comparada com a observada entre a 17^a e 28^a. Outros autores, como Landor, (1995) discorrem que RNs prematuros, principalmente os

extremos, podem não receber níveis protetores de anticorpos, pois a maior parte deles é transferida ao feto após a 34ª semana de gestação.

Para recém-nascidos a termo, os níveis de IgG podem exceder os níveis maternos, o que pode estar associado com a concentração de IgG dentro do sinciciotrofoblasto antes de sua liberação para o espaço intersticial fetal (Longsworth, et al., 1945; Kohler, et al., 1966).

Anticorpos IgG de origem materna presentes no RN de termo correspondem a uma concentração média de, aproximadamente, 1.000 mg/dl. Estes níveis decaem durante os três primeiros meses de vida, ao passo que, os níveis próprios aumentam gradativamente (Ballow, et al., 1986).

Todas as subclasses de IgG atravessam a placenta sendo, porém, diferentes quanto à intensidade, devido às diferenças nas afinidades pelo receptor FcRn presente no trofoblasto (Ishizaka, et al., 1976). Segundo McNabb e colaboradores (1976), a afinidade dos receptores placentários às subclasses de IgG seria maior por IgG1, seguido por IgG3, IgG4 e por último, IgG2. Já no RN, as subclasses de IgG produzidas atingem níveis equivalentes aos de adultos em idades diferentes, como IgG1 e IgG3, em torno de 2 anos de idade e IgG4, por volta dos 6 anos de idade. Os níveis de IgG2 serão semelhantes aos de adultos bem mais tardiamente, somente aos 12 anos de idade (Fujimura, 1991).

1.3 Prematuridade e o transporte de imunoglobulinas

Existem várias situações adversas que delineiam a gestação podendo, muitas vezes, alterar o processo de transferência de imunoglobulinas pelos receptores através da placenta. A prematuridade é uma situação em que baixos níveis de anticorpos de IgG são observados no neonato (Salimonu, et al., 1978; Carvalho, et al., 1988; Nagao, et al., 1999 e 2001).

Há mais de 40 anos, Michaux e colaboradores (1966) verificaram em pares de mães e RNs africanos e europeus, que o transporte de IgG era ativo somente quando os níveis séricos maternos de IgG total eram baixos ou dentro da faixa de normalidade. Quando esses níveis estavam acima de 1.500 mg/dl, os níveis séricos de IgG em sangue de cordão apresentavam uma tendência de serem mais baixos que os níveis maternos correspondentes.

Deste modo, vários estudos foram realizados com o intuito de identificar as possíveis causas de uma baixa transferência placentária de anticorpos IgG. É bem estabelecido que a prematuridade represente uma das situações em que baixos níveis de anticorpos da classe IgG são observados ao nascimento (Salimonu, et al., 1978; Carvalho et al., 1988). Recém-nascidos prematuros têm mostrado níveis reduzidos de subclasses de IgG devido a baixa transferência transplacentária, sendo que o mecanismo que seleciona e ativa este processo ainda não é totalmente conhecido e pode ser multifatorial (Okoko, et al., 2002).

Os receptores da placenta para porção Fc de IgG têm papel fundamental na transcitose e na transferência de IgG para o feto (Okoko, et al., 2001). Esse transporte é pouco eficiente nos RNs prematuros, sabendo-se que esses receptores dependem da idade gestacional para serem expressos, parecendo serem expressos no terceiro trimestre da gravidez (Kameda, et al., 1991). O que justifica a redução na transferência de anticorpos no primeiro período da gestação devido à imaturidade das funções do receptor Fc na placenta (Kamat, et al., 1994).

Alguns estudos já demonstraram a preferência no transporte de alguns anticorpos, tanto no grupo de termos quanto no de pré-termos, dependendo da maturidade dos receptores como também dos níveis maternos de subclasses de IgG (Okoko, et al., 2001).

Existem algumas condições discutíveis quanto à interferência no transporte de imunoglobulinas pela placenta. Diferenças nos níveis de imunoglobulinas de recém-nascidos a termo com baixo peso ao nascimento foram encontradas, onde os níveis de IgG total foram até 35% dos valores de neonatos com peso adequado ao nascimento, enquanto outros estudos não relataram esta redução no transporte (Catty, et al., 1979). Os casos de gemelaridade também promovem discussão entre os pesquisadores apresentando, algumas vezes, o transporte reduzido, mas não em todas as situações (Carvalho et al., 1988; Gelfand et al., 1960). Essa variabilidade pode se dever ao fato de não se observar um fluxo sangüíneo placentário reduzido em todas as situações associadas a baixo peso ao nascimento ou à gemelaridade. Provavelmente, somente quando essa redução no fluxo placentário ocorre é que há uma redução de transmissão materno-fetal de anticorpos.

Segundo Okoko e colaboradores (2001), em estudo com RNs prematuros e com baixo peso ao nascimento, os danos ou a redução dos receptores Fc na placenta podem resultar na redução da transferência de IgG, quando comparados com os RNs a termo com peso normal no nascimento. Entretanto não parece claro neste, e em outros estudos, qual é o diferencial na especificidade da transferência reduzida de anticorpos, tanto para os antígenos virais quanto para os bacterianos estudados (Okoko, et al., 2001; Toivanen et al., 1968; Wesumperuma et al., 1999).

Uma possível explicação seria a variação de resposta de subclasses de IgG para os diferentes antígenos e nas diferentes afinidades dessas subclasses pelo receptor Fc (Ferrante, et al., 1990; Kameda, et al., 1991).

Está descrito na literatura que mães com hipergamaglobulinemia apresentam um transporte reduzido de anticorpos IgG anti-toxoplasma, anti-sarampo e anti-tétano, e supõe-se que a baixa transferência é decorrente da saturação dos receptores FcRn na presença de altos níveis séricos de IgG total da mãe (Brambell, 1966; Richard-Lenoble, et al., 1988;

Gendrel, et al., 1988; Gendrel, et al., 1990). No entanto, a redução no transporte de anticorpos observada na infecção materna pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (De Moraes-Pinto, et al., 1998; De Moraes-Pinto, et al., 1996) e infecção placentária por malária (Brair, et al., 1994; De Moraes-Pinto, et al., 1998) não era devida somente a hipergamaglobulinemia materna. Isso quer dizer que estas infecções já são uma condição suficiente para que ocorra uma redução no transporte de anticorpos para o feto. Entretanto, se a gestante, além dessas condições, apresenta também altos níveis séricos de IgG total, há uma redução ainda mais intensa desse transporte de anticorpos.

Em estudo realizado no Sri Lanka com população de mães anêmicas foi demonstrado que a transferência transplacentária de anticorpos específicos para os toxóides tetânico e diftérico ficou prejudicada, mostrando a importância deste fator (anemia) na transmissão de anticorpos (Wesumperuma, et al., 1999).

Desta forma, as variantes mencionadas acima (anemia, HIV e malária) podem estar associadas a algumas mudanças patológicas que poderiam resultar no mau funcionamento dos receptores da placenta e/ou poderiam aumentar o risco do nascimento de bebês prematuros (Okoko, et al., 2001).

E finalmente, foi demonstrado em estudos que avaliaram a transferência de anticorpos reativos com influenza A2 (Mäntyjärvi, et al., 1970), herpes simplex, tétano, estreptolisina O e *S. pneumoniae* (De Moraes-Pinto, et al. 1998) e para o polissacarídeo do *H. influenzae* do tipo b (Hib), neste último caso após a imunização materna (Englund, et al., 1995), que a eficiência do transporte placentário de anticorpos diminui à medida que o nível materno desses anticorpos aumenta. Em outras palavras, gestantes que apresentam altos níveis de anticorpos específicos a um patógeno, transmitem somente esses anticorpos numa taxa mais baixa

aos fetos, o que sugere que a passagem de anticorpos através da placenta pode não depender somente da porção Fc.

1.4. Lipopolissacarídeo e repercussão no sistema imune

Os antígenos ao entrarem em contato com o sistema imune humoral do RN podem desencadear vários tipos de respostas imunes, dependendo de sua constituição. Eles podem ser classificados como timo-dependentes (TD) ou timo-independentes (TI), sendo que os últimos podem ser do tipo 1 ou do tipo 2.

Os antígenos TD compreendem proteínas solúveis presentes em células e microrganismos e para ativarem as células B, requerem o contato direto com células T auxiliares, permitindo o switch de classes de imunoglobulinas, maturação por afinidade e memória imunológica.

Os antígenos TI são constituídos por polímeros compostos por múltiplos determinantes antigênicos, como polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucleicos e por isso são subdivididos em TI do tipo 1 e do tipo 2. Os primeiros são glicolipídeos, como o LPS e os do tipo 2 são polissacarídeos com alto peso molecular, e para os quais a resposta de anticorpos nos seres humanos é, geralmente, de baixa afinidade e consiste basicamente de IgM, porém com mudança de isotipo limitada a alguns tipos de IgG, como a subclasse IgG2, porém já foi encontrada resposta de IgG1 (Stein, 1992). Os antígenos TI do tipo 1 e 2 são diferenciados pela capacidade dos antígenos TI do tipo 1 de ativar células B policlonalmente, o que os TI do tipo 2 não fazem (Rijkers, et al., 1998).

Em bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS) representa um dos principais fatores de virulência expostos na membrana externa e é constituído por três regiões estruturais distintas: antígeno O, *core* e o lipídio A.

Figura 2: Desenho esquemático da parede de celular de bactérias Gram-negativas. Membrana externa composta por lipopolissacarídeo (LPS).

Fonte: Adaptado de: Madigan et al., 2004.

Dentre as respostas imunes mais caracterizadas em mamíferos está a resposta para o lipídio A das bactérias Gram-negativas, o componente bioativo da endotoxina ou LPS (Raetz, 1993; Medzhitov e Janeway, 1997).

Em uma bactéria viável, o LPS tem sua atividade biológica inibida por manter o lipídio A “escondido” na membrana (Proctor, et al., 1995). Por outro lado, após a morte bacteriana, por autólise da membrana celular, o LPS proveniente de bactérias patogênicas ou não, é liberado na circulação sistêmica, podendo ligar-se a várias proteínas ligantes, tais como, proteína ligante do LPS (LBP), lipoproteínas séricas de baixa densidade, albumina, transferrina e frações do complemento (C1 e C3).

O LPS livre ou associado a essas proteínas liga-se a membrana de monócitos, macrófagos ou de outras células (linfócitos T e B e células endoteliais) através do receptor CD14. Este irá ativar as células do hospedeiro através de receptores *Toll-like* 4, estimulando a transcrição e tradução de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias como

TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-8, através da ativação do fator de transcrição NF- κ B.

Esta ativação resulta em grande alcance da resposta imune, incluindo ativação e destruição de fagócitos, migração de células do hospedeiro para o sítio da inflamação e eliminação da invasão bacteriana.

O reconhecimento e a eliminação de micróbios e a produção de citocinas também são responsáveis pelos sintomas da doença. O LPS primeiramente ativa células e depois é neutralizado para prevenir uma excessiva estimulação do sistema imune (Heumann, et al., 2002). Assim, uma resposta inflamatória excessiva pode levar ao choque séptico e morte (Ernst, et al., 2001).

O LPS na circulação provoca vários efeitos sistêmicos, como vasodilatação acentuada pelo aumento da permeabilidade vascular, diminuição da contratilidade cardíaca e hipertensão pulmonar. Em estágios mais graves, pode ocorrer coagulação intravascular disseminada, hipoglicemia e falência múltipla dos órgãos (fígado, rim, coração, pulmões), seguida de morte (Proctor, et al., 1995).

1.5 Epidemiologia das infecções neonatais

Aproximadamente 50% das 7,5 milhões de mortes de crianças no mundo ocorrem nas primeiras 4 semanas após o nascimento, chamado de período neonatal. A taxa de mortalidade neonatal na América do Sul é de 14 para cada 1.000 nascidos vivos (World Health Organization-WHO, 2006).

No ano 2000, ocorreram mais de 6,3 milhões de mortes no período perinatal (de 22 semanas completas de gestação até sete dias completos após nascimento) em todo o mundo, sendo quase 98% destas, ocorridas nos países em desenvolvimento (World Health Organization- WHO, 2006).

Analisando-se mais especificamente, com relação a mortalidade atribuída às infecções, estima-se que 1,8 milhões de crianças morrem anualmente, predominantemente durante o primeiro ano de vida em países em desenvolvimento. As taxas de mortalidade neonatal são altas, em torno de 40 a 50 mortes em cada 1.000 nascidos vivos em muitas regiões do mundo (Hyder, et al., 2003).

Estudos no Brasil e na Indonésia têm reportado taxas de infecções adquiridas em hospitais extremamente altas, atingindo 52% entre todas as admissões nas Unidades de Tratamento Intensivo de Alto Risco Neonatal (Sjahrodji, 1990; Nagata, et al., 2002).

As bactérias Gram-negativas são os principais patógenos responsáveis pela sepse neonatal nos países em desenvolvimento. Em um estudo com 11.471 amostras de sangue foi demonstrado que as bactérias Gram-negativas foram isoladas em, pelo menos, 60% das culturas de sangue positivas nas regiões em desenvolvimento no mundo (Zaidi, et al., 2005). Neste estudo, os autores descrevem a situação dos países em desenvolvimento relacionando as infecções neonatais adquiridas nos hospitais. As espécies de bactérias Gram-negativas como *Klebsiella*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* são confirmadas com o percentual de incidência, respectivamente, de 22,8%, 12,2% e 7,9% dentro de um total de 60,5% das bactérias Gram-negativas responsáveis pelas infecções neonatais graves. As taxas de casos fatais variam entre 12% e 52%, com taxas igualmente altas de sepse relacionadas a linhagens de bactérias Gram-negativas (Zaidi, et al., 2005).

O espectro de patógenos nos países em desenvolvimento é um pouco diferente do observado nas regiões desenvolvidas, onde os estreptococos do grupo B, *Escherichia coli* e estafilococos coagulase-negativos são os patógenos predominantes (Sanghvi e Tudehope, 1996; Stoll, et al., 2002).

Dados de um estudo prospectivo de dez anos, realizado por Couto e colaboradores (2007) no Brasil, em seis Unidades de Tratamento Intensivo Neonatal, revelaram que a maior incidência de infecções sistêmicas foi ocasionada por bactérias Gram-negativas (51,6%), sendo destas, 26,6% causadas por *Klebsiella sp*, 9,7% por *Escherichia coli* e 6,4% por *Pseudomonas aeruginosa*. Um grande número de bactérias patogênicas foi encontrado nas fezes de recém-nascidos pré-termos compondo a sua microbiota, sendo confirmado o mesmo por Schwiertz e colaboradores (2003) através de métodos moleculares de identificação bacteriana.

Klebsiella, um membro normal da flora do trato gastrointestinal, tem emergido, a partir da década de oitenta, pelo uso indiscriminado de antibióticos. Até recentemente, o antígeno O de *Klebsiella* era descrito como oculto pela cápsula composta por polissacarídeos, que representam os fatores de virulência mais estudados nesta espécie e desta forma, não estava exposto na superfície bacteriana. No entanto, estudos demonstram uma exposição dos antígenos O em cepas bacterianas expressando sorotipos capsulares particulares (Tomás, et al., 1988).

Na flora intestinal de neonatos prematuros, especialmente aqueles internados em UTIs, o estabelecimento de *Klebsiella spp* é extremamente prevalente (Charles et al., 2005), representando um sério risco de desencadear infecções generalizadas logo após o nascimento ou durante a hospitalização prolongada (Moor, 1996). Quando inoculada parietalmente, possui uma notável habilidade de causar uma larga extensão de doenças humanas, desde infecções no trato urinário até pneumonias (Sahly e Podschun, 1997).

Infecções causadas por *K. pneumoniae* têm sido reportadas na gravidez e estão associadas com mortes em neonatos (Charles, et al., 2005), apresentando uma alta morbidez, particularmente em prematuros internados em UTIs neonatais (Poduschun e Ullmann, 1998) e, muitas vezes, estão envolvidas em casos de sepse neonatal (Gotoff, 1992).

Já *Escherichia coli* (*E. coli*) é a bactéria gram-negativa anaeróbia facultativa predominante na flora intestinal humana. Este microrganismo coloniza o trato gastrointestinal de crianças dentro de poucas horas de vida, e desenvolve uma relação de mutualismo com o hospedeiro (Nataro e Kaper, 1998). No hospedeiro debilitado ou imunossuprimido, ou quando as barreiras gastrintestinais são violadas, mesmo cepas “não-patogênicas” de *E. coli* podem causar infecção, que pode ficar limitada à superfície mucosa ou pode disseminar-se por todo o organismo (Nataro e Kaper, 1998).

E. coli foi citada na revisão de Zaidi e colaboradores (2005), como a segunda bactéria Gram-negativa mais prevalente envolvida em infecções neonatais ocorridas em países em desenvolvimento, embora os sorogrupos prevalentes não estejam relatados nos diversos países nos quais o levantamento foi efetuado.

Vários sorotipos de *E. coli* foram descritos nas décadas passadas como envolvidos em infecções neonatais, sepse e diarreias infantis. McCracken e colaboradores descreveram, em 1974, o sorogrupo O6 entre os mais freqüentes em líquido cefalorraquidiano de RNs com meningite. Freij e colaboradores (1999) relataram casos de sepse em que o sorotipo O6 também estava presente. Em um estudo, realizado em São Paulo, verificou-se que o sorotipo O6 de *E. coli* foi freqüentemente isolado de amostras de pacientes hospitalizados com infecções invasivas, principalmente na faixa etária entre 0 e 3 meses (Giardi-Dias, 1992).

Nas décadas de oitenta e noventa, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), foi reportada como a principal causa de diarreia infantil em São Paulo, em crianças menores do que um ano de idade, sendo o sorotipo O111:H⁻, um dos mais freqüentemente isolados (Gomes, et al., 1991 e 1996). Este sorogrupo foi o mais extensivamente estudado, estando presente em várias categorias de *E. coli* diarreiogênicas como EPEC, EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) e EAggEC (*E. coli* enteroagregativa).

Segundo Nataro e Kaper (1998), entre os sorogrupos associados à EPEC, O26 e O111 foram epidemiologicamente predominantes em casos de diarreias infantis, especialmente nos países em desenvolvimento. Quando pertencentes à categoria das EHEC, os sorotipos O26 e O111 vêm apresentando uma maior frequência em todo o mundo, sendo considerados patógenos emergentes.

No trabalho de Franzolin e colaboradores (2005), realizado em Salvador, foram identificados vários sorogrupos de *E. coli* diarreiogênicas em amostras fecais de crianças em idade escolar com diarreia. As EPEC atípicas foram as mais frequentemente isoladas, porém não foram identificadas linhagens do sorogrupo O111 entre nenhuma das categorias identificadas. Neste trabalho, foi identificado o sorotipo O26:H11, pertencente à categoria de EHEC, sendo descrito como o primeiro isolado em Salvador. Este sorotipo já havia sido isolado em 2002, em São Paulo, de uma criança com Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) (Guth, et al., 2002).

Em um recente trabalho realizado em Rondônia, foram relatados 470 casos de diarreia sendo, 251 casos ocorridos entre infantes até 1 ano de idade, e a EPEC foi responsável por 29 casos (6,1% do total), demonstrando que linhagens de EPEC ainda estão associadas a quadros de diarreia infantil, embora em menor frequência do que nas décadas passadas (Orlandi, et al., 2006).

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista, pois raramente causa doença pulmonar em hospedeiros normais, mas é uma importante causa de pneumonia aguda em pacientes imunocomprometidos, incluindo os neonatos (Leigh, et al., 1995) e pacientes infectados com HIV (Fichtenbaum, et al., 1994). Também é uma causa importante de pneumonia crônica em pacientes com fibrose cística (Tang, et al., 1996). Pode causar infecções no trato urinário, no sistema respiratório, dermatites, infecções gastrointestinais e uma variedade de infecções

sistêmicas, particularmente em pacientes com queimaduras severas ou imunossuprimidos, apresentando uma taxa de fatalidade de 50% nesses casos.

A maioria das infecções por essas bactérias é invasiva e toxicogênica. *P. aeruginosa* pode ser eliminada pela ação de leucócitos polimorfonucleares, mas a morte bacteriana é mais eficiente sob ação de anticorpos opsonizantes direcionados primariamente para determinantes antigênicos do LPS. Observa-se que pacientes com resposta de anticorpos diminuída, causada por doença ou terapia associada, apresentam maior freqüência e maior severidade da infecção, confirmando a importância da resposta imune mediada por anticorpos. Não foi descrito um importante papel da imunidade celular na defesa contra infecções por este patógeno (Leigh, et al., 1995).

A despeito dos avanços tecnológicos em relação ao desenvolvimento de drogas de maior potência antibacteriana, *P. aeruginosa* permanece como um dos agentes de infecções hospitalares mais prevalentes em todo mundo, principalmente devido às suas características naturais de resistência, mantendo-se em papel de destaque frente às dificuldades terapêuticas (Arruda, 1998).

Ao nascerem, os bebês não possuem uma microbiota residente e rapidamente são colonizados por micróbios presentes no trato genital materno e pelo ambiente imediato, o que os torna mais susceptíveis a desenvolver infecções invasivas se expostos a microrganismos potencialmente patogênicos.

Freqüentemente, os neonatos pré-termos apresentam retardo de crescimento intra-uterino e necessitam de medidas que auxiliem a sua sobrevivência. Embora os avanços na área da terapia intensiva tenham possibilitado a sobrevivência de RNs prematuros, bebês freqüentemente necessitam permanecer internados em UTIs por tempo prolongado,

ocasionando um maior tempo de exposição a microrganismos responsáveis pela ocorrência de infecções hospitalares. Além disso, os procedimentos invasivos necessários expõem os RNs pré-termos a infecções por patógenos que podem causar sepse (Krebs e Taricco, 2004). Estudos demonstram que a incidência de sepse é inversamente proporcional à idade gestacional e ao peso de nascimento (Zaki et al., 1990).

Recém-nascidos em UTIs são praticamente privados do contato com a flora bacteriana materna sendo que, qualquer bactéria materna é combatida pelos antibióticos de largo espectro, o que facilita a colonização com bacilos Gram-negativos aeróbios hospitalares. Os microrganismos prevalentes na UTI neonatal, no momento da chegada do RN se estabelecem, principalmente, no nariz, garganta e intestino (AGIH, 2006). Após a colonização do intestino, estes bacilos proliferam intensamente por longos períodos, o que torna bastante provável a colonização das mãos da equipe e, conseqüentemente, dos novos bebês admitidos. Esta colonização se torna ainda mais possível se houver necessidade de manipulação nasofaríngea ou gastrintestinal (aspiração, ventilação com máscara, alimentação nasogástrica) (AGIH, 2006).

Tem sido considerado que neonatos são susceptíveis a infecções invasivas partindo-se do pressuposto que anticorpos contra LPS são do isotipo IgM, ou seja, de produção própria do RN, e portanto estariam ausentes no início da vida (Lewis e Wilson, 2006).

Senhauser e colaboradores (1990), demonstraram a presença de anticorpos IgG contra extrato de *E. coli* contendo um *pool* de antígenos O mais freqüentemente encontrados nas fezes (O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18, O75). Os resultados mostraram que soros de neonatos apresentavam títulos de anticorpos inferiores aos títulos maternos; no entanto, foi verificado que os índices de avidéz destes anticorpos nos neonatos estavam mais elevados do que aqueles determinados no soro materno (Blanco, et al., 1990; Gransden, et al., 1990).

Nagao e colaboradores (1998), revelaram a existência de passagem transplacentária de anticorpos IgG anti-LPS, a partir da demonstração que IgG1 e IgG2 do soro materno e de cordão umbilical apresentam um reconhecimento idêntico de várias frações antigênicas de LPS de *Escherichia coli* O6, O16 e O111, com títulos e avides dos anticorpos similares aos maternos. A confirmação da identidade foi dada pela análise dos clonotipos de anticorpos no soro do cordão, visto que foram idênticos àqueles encontrados no soro materno.

Em outro trabalho, foram determinadas as concentrações de IgA, IgG e IgM anti-LPS O111 em amostras de soro e de colostro materno e do soro de cordão umbilical dos respectivos RNs a termo e pré-termos com idade gestacional entre 25 e 36 semanas. Verificaram-se níveis significativamente menores de IgG anti-LPS O111 no grupo de recém-nascidos pré-termos quando comparados ao grupo de RNs nascidos a termo (Nagao, et al., 2001).

Baseados nestes dados, e na frequência das infecções neonatais causadas por bactérias Gram-negativas em nosso ambiente, achamos de extrema relevância o estudo da passagem transplacentária de anticorpos IgG dirigidos a diferentes LPS, tanto os presentes em enterobactérias prevalentes em infecções neonatais locais ou sistêmicas, como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* O6, assim como aqueles associados a infecções gastrintestinais, como *E. coli* O111 e O26 que poderiam, eventualmente, ser transmitidos para o recém-nascido durante o processo de colonização do trato gastrintestinal.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a aquisição passiva de anticorpos IgG maternos reativos com os lipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* O111, O26, O6 e *Pseudomonas aeruginosa*, em recém-nascidos pré-termos e a termo.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar as concentrações e taxas de transferência de IgG total em amostras de pareadas de soros de parturiente e dos soros de cordões umbilicais de seus respectivos recém-nascidos pré-termos e a termo;

- Analisar as concentrações e taxas de transferência de IgG específica para os lipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* O111, O26, O6 e *Pseudomonas aeruginosa* nas mesmas amostras;

- Analisar a presença de anticorpos IgM reativos com os mesmos lipopolissacarídeos nas amostras de soro das mães recém-nascidos pré-termos e a termo;

- Avaliar a influência das patologias de base detectadas nas mães de recém-nascidos pré-termos e a termo e/ou intercorrências ocorridas durante o parto sobre os níveis de anticorpos IgG e IgM totais e específicos e taxas de transferência.

3 METODOLOGIA

3.1 Casuística

Foram coletados no Berçário Anexo à Maternidade do Hospital das Clínicas da FM-USP, 29 conjuntos de amostras pareadas de soro materno e de soro de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos pré-termos. Devido à presença de 1 conjunto de amostras pareadas de gemelares e 1 de trigemelares, o número amostral deste grupo resultou em 29 amostras de soro materno e 32 amostras de soro de recém-nascidos pré-termos. O grupo de pré-termos apresentou, ao nascimento, idade gestacional entre 25 3/7 e 36 5/7 semanas, sendo 11 amostras de neonatos nascidos entre 25 3/7 e 33 semanas de gestação e 21 amostras de neonatos nascidos entre 33 2/7 e 36 5/7 semanas de gestação.

No grupo de mães de recém-nascidos pré-termos, algumas parturientes apresentavam patologias de base ou foram detectadas intercorrências durante o parto, que estão descritas em anexo (**Anexo 1, Tabela 1**). Deste modo, para a análise posterior da influência destes parâmetros nos níveis de anticorpos IgG e IgM totais e específicos e taxas de transferência, as amostras pareadas de mães e RNs pré-termos foram divididas em dois subgrupos: o primeiro foi constituído por 15 amostras de soro materno e 15 amostras de soro de seus respectivos RNs, provenientes de mães com patologias e o segundo grupo foi constituído por 14 amostras de soro materno e 17 amostras de soro de seus respectivos RNs (1 grupo de gêmeos e um de trigêmeos), provenientes de mães sem patologias.

O grupo de recém-nascidos a termo foi constituído por 32 conjuntos de amostras pareadas de soro materno e de soro de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos a termo. Neste grupo, a idade gestacional dos recém-nascidos variou entre 37 1/7 e 41 6/7 semanas.

Como no grupo de termo, algumas parturientes também apresentavam patologias de base ou foram descritas intercorrências

durante o parto, as amostras pareadas de mães e RNs a termo também foram divididas em dois subgrupos: o primeiro foi constituído por 16 amostras de soro materno e de seus respectivos RNs, provenientes de mães com patologias e o segundo grupo foi constituído por 16 amostras de soro materno e de seus respectivos RNs, provenientes de mães sem patologias

O projeto obteve prévia aprovação da Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPEsq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram adotados como critérios de inclusão, mães que apresentavam idade superior a 18 anos. Foram excluídas as mães portadoras de testes sorológicos positivos para doenças infecciosas (HIV, CMV, hepatite, sífilis, toxoplasmose, rubéola e herpes); mães de recém-nascidos pós-termo; mães de recém-nascidos portadores de síndromes genéticas.

Foram considerados recém-nascidos pré-termos, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006), aqueles com idade gestacional inferior a 37 semanas de gestação (36 6/7) e a termo, os recém-nascidos com idade gestacional entre 37 e 41 semanas e seis dias.

A idade gestacional foi determinada considerando-se a data da última menstruação (DUM) e, quando não foi possível, utilizou-se a ultra-sonografia fetal. Na avaliação clínica da idade gestacional, quando surgiram dúvidas sobre a data da última menstruação e na ausência do exame de ultra-sonografia, foi utilizado o método de Capurro (1978) para os recém-nascidos a termo e New Ballard (1991) para os recém-nascidos pré-termos.

As amostras de sangue das gestantes foram obtidas no momento da coleta para exames de rotina no Centro Obstétrico mediante o

conhecimento prévio da pesquisa e autorização por escrito da mesma. Após dequitação da placenta, as coletas de sangue do cordão foram realizadas em tubo seco, e após retração do coágulo da placenta, as mesmas ficaram em repouso por 10 minutos e foram centrifugadas a 400 x g, por 20 minutos a temperatura ambiente. As amostras de soro foram levadas ao Laboratório de Imunologia de Mucosas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e armazenadas a -20 °C em alíquotas de 100 µl com sua respectiva identificação.

Para a realização dos ensaios desde a padronização até os ensaios com as amostras dos pacientes foi utilizado um pool de soro de adultos saudáveis como curva padrão dos ensaios. Dois pools de soro humano normal foram usados como controles dos ensaios. Um dos pools, foi preparado com amostras de soro de 12 adultos saudáveis do sexo masculino e feminino, apresentando resultados negativos nos testes sorológicos convencionais, com faixa etária entre 21 e 42 anos. O segundo pool controle já estava disponível no laboratório, preparado em trabalhos anteriores.

3.2 Antígenos Utilizados

Foram utilizados os lipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* (L-4268, Sigma, USA), proveniente do ATCC, cepa 15380; *Pseudomonas aeruginosa* sorotipo 10, ATCC, cepa 27316 (L-9143, Sigma, USA), ambas isoladas de pacientes com infecção hospitalar; e os LPS O111:B4 e O26:B6 de *Escherichia coli* (L-2630 e L-8274, respectivamente, Sigma, USA). As preparações comerciais de LPS foram purificadas pelo método de extração por fenol à quente e a pureza foi avaliada pelo método de Lowry, para verificar a contaminação por proteínas, que se manteve dentro do nível limite de 3 %. Cada LPS foi estocado a temperatura de 4 °C.

O LPS de *Escherichia coli* O6 foi previamente extraído de uma cepa de *E. coli* sorotipo O6:K2ac:H1, de acordo com técnica descrita por Westphal e Jann (1965), que também utiliza o fenol à quente para extração, com algumas modificações.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Dosagem de IgG e IgM total por imunodifusão radial quantitativa (IDRQ)

A técnica de IDRQ consiste no preparo de agarose a 1% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 e transferência para o banho a 56 °C até a estabilização da temperatura. Para dosagem de anticorpos totais, para cada 6 ml de agarose, foram colocados 70 µl de anti-IgG humano ou 30 µl de anti-IgM humano, ambos desenvolvidos em carneiro (Biolab®).

Para a dosagem de IgG total foi utilizado soro padrão (Beckman Coulter, USA) nas concentrações de 2.385,0 a 37,26 mg/dl, para a obtenção da curva padrão. Para a dosagem de IgM total também foi utilizado soro padrão (Beckman Coulter, USA) nas concentrações de 192 a 3 mg/dl, para a obtenção da curva padrão de IgM. Dois controles foram utilizados a partir de soros de indivíduos sadios, diluídos a 1:20 e 1:40 para a dosagem de IgG e utilizados puros e diluídos 1:2 para a dosagem de IgM. As demais amostras a serem testadas também foram diluídas a 1:20 e 1:40 (IgG) e utilizadas puras e diluídas 1:2 na dosagem de IgM. Em ambos os testes, foram aplicados 5 µl por halo de cada amostra (devidamente diluídas em tampão PBS pH 7,4).

A seguir, as placas foram incubadas em câmara úmida por 48 horas (IgG) ou 72 horas (IgM) a 4 °C. Após esse período, os diâmetros dos halos de precipitação foram medidos e um gráfico com a curva padrão para a obtenção dos valores da concentração de IgG e IgM de cada amostra foi

construído. Os valores obtidos das concentrações das amostras no gráfico foram multiplicados pelos valores de suas respectivas diluições para a obtenção do valor real da concentração de IgG e IgM nos soros, que foi expressa em mg/dl.

3.3.2 Dosagem de anticorpos IgM e IgG reativos com os diferentes LPS por método imunoenzimático (ELISA)

3.3.2A Padronização do método imunoenzimático para determinação de anticorpos IgM e IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *E. coli* O6, O111 e O26

Os testes foram padronizados utilizando-se o método de Fomsgaard (1990) para determinação das concentrações de anticorpos IgM e IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*, anti-LPS O111, O26, O6 e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*. Foram utilizados um pool de soro humano normal como padrão, cuja concentração foi determinada a partir de um padrão primário, e dois pools de soro humano normal, como controles dos testes. O protocolo consiste na dosagem, na mesma placa, dos níveis totais de imunoglobulinas e de anticorpos anti-LPS, utilizando mesma concentração de anticorpo de captura (anti-IgM e anti-IgG), mesma concentração de LPS de *K. pneumoniae*, de *E. coli* O111, O26, O6 e de *P. aeruginosa*, nas mesmas condições de incubação, diluição do conjugado e solução de substrato.

Deste modo, microplacas de 96 cavidades (Costar cód. 3590, USA) foram divididas ao meio, sendo metade da placa adsorvida com anticorpos anti-IgM ou anti-IgG e a outra metade da placa adsorvida com o LPS das bactérias alvo do estudo. Foram utilizados, em ambos os lados da placa, os mesmos pools de soro humano normal (pools controles) e o pool de soro padrão, ambos previamente preparados e já descritos anteriormente.

As diluições destes pools foram diferentes de acordo com o lado da placa: para a dosagem de IgG ou IgM total, os pools foram utilizados em uma diluição inicial de 1:200.000 e 1:5.000, respectivamente, e para a dosagem de IgG ou IgM específica, 1:50 e 1:20, respectivamente.

Resumidamente, IgG e IgM purificados (Sigma, USA) foram utilizados como padrões primários nas concentrações de 1,95 a 250 ng/ml para IgG e 0,48 a 62,5 ng/ml para IgM. Os pools de soro humano normal foram diluídos e incubados em uma mesma placa onde, metade da placa havia sido adsorvida com 10 µg/ml de anti-IgG ou anti-IgM humanos, e a outra metade, os diferentes LPS, também a 10 µg/ml. Os padrões primários foram incubados na parte da placa que foi adsorvida com os anticorpos anti-imunoglobulinas, enquanto os pools foram diluídos e incubados nas duas metades da placa. Após 18 h, a 4 °C, a placa foi lavada e incubada com os conjugados anti-IgG ou anti-IgM humanos marcados com peroxidase, nas diluições de 1:2.000 e 1:1.000, respectivamente, durante 2 h a 37 °C. Após novas lavagens, a solução de substrato foi adicionada à placa.

A concentração de anticorpos IgG ou IgM anti-LPS do pool considerado como padrão foi calculada comparando-se a absorbância obtida deste pool na metade da placa adsorvida com LPS, com a absorbância da curva padrão primária, com concentração conhecida de IgG ou IgM, testada na outra metade da placa, que foi adsorvida com anticorpos anti-imunoglobulinas humanas. Este teste foi realizado diversas vezes para cada anticorpo (IgG ou IgM) e para cada LPS a ser testado. Uma média dos valores foi calculada para cada teste e considerada como a concentração do padrão secundário (pool de soro humano testado em ambos os lados da placa).

3.3.2B Método imunoenzimático

Após as padronizações, os testes foram realizados utilizando-se microplacas de 96 poços (Costar, USA) adsorvidas com 10 µg/ml de LPS de *K. pneumoniae*, ou com LPS O6, O111, O26 ou de *P. aeruginosa* diluídos em PBS pH 7,4. Após incubação por 16 a 18 h a 4 °C, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,1 % e o bloqueio realizado com leite Molico a 1 % em PBS pH 7,4, por 1 h a temperatura ambiente. A seguir, foram adicionadas as amostras de soro das mães e dos RNs a serem testadas, o pool de soro humano normal usado como padrão e os outros dois pools de soro de adultos saudáveis utilizados como controle em todos os ensaios, em quatro diluições seriadas e em duplicata. As amostras foram testadas em diluições variando de 1:20 a 1:400 em PBS-NaCl 0,5 M Tween 0,2 % e incubadas por 18 h a 4 °C. Depois de novas lavagens, as placas e foram incubadas com conjugado anti-IgG ou anti-IgM humano marcados com peroxidase (Sigma, USA) nas diluições de 1:2.000 e 1:1.000, respectivamente, por 2 h a 37 °C. Em seguida às lavagens, foi adicionada solução de substrato contendo 0,4 mg/ml de ortofenilenodiamina (OPD, Sigma, USA) em solução de citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0 e água oxigenada (H₂O₂) a 0,01 %. Após 30 minutos de incubação ao abrigo da luz, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 2,5 N. A absorbância foi mensurada em leitor para microplacas no comprimento de onda de 492 nm (Labsystems, Finland).

O programa Graphpad Prism foi utilizado para montar curvas de semi-log a partir das densidades óticas (D.O.s) obtidas por meio da leitura das placas de ELISA. Os resultados foram expressos em concentração (µg/ml), determinada através da curva semi-logarítmica feita a partir dos resultados das D.O.s em função do log₁₀ das concentrações da curva padrão. A partir da curva, as concentrações das amostras foram determinadas por interpolação na curva.

3.3 Análise Estatística

No presente trabalho, além da análise estatística descritiva, utilizada para calcular médias, medianas, desvios padrão e intervalos de confiança, foram utilizados os seguintes testes:

- Teste de Wilcoxon - teste não paramétrico utilizado na análise comparativa das medianas de anticorpos entre as amostras pareadas de soro das mães e seus respectivos recém-nascidos pré-termos e a termo.

- Teste de Mann-Whitney - teste não paramétrico utilizado para análise de dados relacionados não pareados das amostras de soro das mães e dos recém-nascidos pré-termos e a termo.

- Teste de correlação de Spearman – teste não paramétrico utilizado para estabelecer as correlações entre cada par de variáveis.

- Teste de Kruskal-Wallis - teste não paramétrico utilizado na análise comparativa das medianas de anticorpos de 3 ou mais grupos não pareados.

- Teste de Dunn - teste posterior ao Kruskal-Wallis, de comparações múltiplas para a identificação de quais grupos de dados são diferentes entre si.

Os testes foram realizados com limites de intervalo de confiança de 95%, e um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Grupo Amostral

O grupo de recém-nascidos pré-termos foi constituído por 29 conjuntos de amostras pareadas de soro materno e de soro de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos pré-termos. No entanto, devido à presença de 1 conjunto de amostras pareadas de gemelares e 1 de trigemelares, o número amostral deste grupo resultou em 29 amostras de soro materno e 32 amostras de soro de recém-nascidos pré-termos. O grupo de pré-termos apresentou, ao nascimento, idade gestacional entre 25 3/7 e 36 5/7 semanas, sendo 11 amostras de neonatos nascidos entre 25 3/7 e 33 semanas de gestação e 21 amostras de neonatos nascidos entre 33 2/7 e 36 5/7 semanas de gestação.

O grupo de recém-nascidos a termo foi constituído por 32 conjuntos de amostras pareadas de soro materno e de soro de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos a termo. Neste grupo, a idade gestacional dos recém-nascidos variou entre 37 1/7 e 41 6/7 semanas (**Figura 3; Tabela 1**).

Figura 3. Número de recém-nascidos pré-termos e a termo e suas respectivas idades gestacionais.

Tabela 1. Número de amostras de recém-nascidos pré-termos e a termo com suas respectivas idades gestacionais representadas em semanas.

Recém-nascidos		
	Idade gestacional (s)	Nº de amostras
Grupo Pt ≤ 33 semanas	25 - 26	1
	26 - 27	1
	28 - 29	1
	29 - 30	1
	30 - 31	2
	31 - 32	1
	32 - 33	4
	Total Média	11 30 1/6 (s)
Grupo Pt > 33 semanas	33 - 34	5
	34 - 35	4
	35 - 36	5
	36 - 37	7
	Total Média	21 35 (s)
Grupo Termo ≥ 37 semanas	37 - 38	5
	38 - 39	13
	39 - 40	6
	40 - 41	6
	41 - 42	2
	Total Média	32 39 (s)

Pt: Pré-termos; s: semanas.

4.2 Concentrações séricas de IgG total

A análise dos níveis séricos totais de anticorpos IgG nas amostras de soro de mães e recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas e > 33 semanas e mães com seus respectivos recém-nascidos a termo está representada na **Tabela 2 e Figura 4**.

Tabela 2. Análise estatística descritiva das concentrações de IgG sérica total (mg/dl) e das taxas de transferência de IgG total (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo.

	Grupo Pt ≤ 33 sem (11)*			Grupo Pt > 33 sem (21)			Grupo Termo (32)		
	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)
Média	691,4	603,4	99,9	727,3	663,1	110,5	881,6	1060,3	124,4
Med	699,0	534,0	83,3	751,0	675,0	100,5	910,0	1093,0	124,4
DP	272,9	284,5	64,4	297,8	269,6	75,0	223,0	222,7	28,9
Mín	424,0	207,0	28,9	151,0	134,0	12,5	397,0	431,0	76,0
Máx	1212,0	1052,0	231,7	1182,0	1230,0	374,2	1402,0	1428,0	198,2
IC ↓	599,3	412,2	56,6	631,6	540,3	76,3	804,1	980,0	114,0
IC ↑	823,6	794,5	143,2	822,9	785,8	144,6	959,0	1140,6	134,9
Teste de Wilcoxon	—			—			$p < 0,0001$		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; M: mãe; RN: recém-nascido; T: taxa de transferência; Med: mediana; DP: Desvio padrão; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo; IC ↓ : Intervalo de confiança inferior; IC ↑ : Intervalo de confiança superior; — : diferença não significativa.

Quando foram comparados os níveis séricos de anticorpos IgG entre mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de RNs a termo, estes 3 grupos não apresentaram diferença estatística significativa (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,052$). Por outro lado, foram encontradas diferenças significativas quando os dois grupos de RNs pré-termos foram comparados ao grupo de RNs a termo ($p < 0,05$).

Os valores das taxas de transferência verificados em recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas e > 33 semanas também foram estatisticamente diferentes quando comparados a taxa verificada em RNs a termo ($p < 0,05$).

Figura 4. Concentrações séricas de IgG total (mg/dl) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG total (%) (eixo Y direito) nos três grupos. M: amostras de soro materno; RN: amostras de soro de cordão umbilical dos recém-nascidos; s: idade gestacional em semanas.

As concentrações de IgG total observadas nos RNs pré-termos não apresentaram correlação com os níveis maternos, já nos bebês nascidos a termo foi encontrada correlação estatisticamente significativa com os respectivos níveis maternos ($r = 0,6583$, $p < 0,001$). Foi observada correlação entre as taxas de transferência e níveis de IgG total no RN pré-termo ($r = 0,6153$, $p < 0,01$) e uma correlação inversa entre níveis de IgG maternos e taxas de transferência no grupo termo ($r = -0,5121$, $p < 0,01$) e no grupo pré-termo ($r = -0,4562$, $p < 0,05$), revelando que as taxas de transferência são inversamente proporcionais aos níveis de IgG materno.

4.3 Dosagem de Anticorpos IgG Específicos

4.3.1 Concentrações de IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*

A análise dos níveis de anticorpos IgG anti-LPS de *Klebsiella* nas amostras de soro de mães e de recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e de recém-nascidos a termo e suas taxas de transferência estão representadas na **Tabela 3 e Figura 5**.

Tabela 3. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* ($\mu\text{g/ml}$) e das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo.

	Grupo Pt ≤ 33 sem (11)*			Grupo Pt > 33 sem (21)			Grupo Termo (32)		
	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)
Média	1,21	0,85	71,04	1,22	0,88	82,39	0,83	0,77	106,50
Med	0,97	0,65	70,87	0,86	0,62	79,07	0,69	0,65	89,79
DP	1,03	0,74	16,43	1,64	0,99	32,95	0,58	0,44	55,10
Mín	0,25	0,2	45,11	0,2	0,15	16,48	0,2	0,2	47,62
Máx	3,86	2,8	105,19	8,0	4,53	143,48	2,7	1,9	325,0
IC ↓	0,51	0,34	60,0	0,47	0,42	67,39	0,62	0,61	86,63
IC ↑	1,9	1,35	82,0	1,97	1,33	97,39	1,0	0,93	126,36
Teste de Wilcoxon	$p < 0,01$			$p < 0,05$			—		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; M: mãe; RN: recém-nascido; T: taxa de transferência; Med: mediana; DP: Desvio padrão; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo; IC ↓ : Intervalo de confiança inferior; IC ↑: Intervalo de confiança superior; — : diferença não significativa.

Quando comparados os níveis de anticorpos IgG anti-LPS *Klebsiella* entre mães de recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo, estes não apresentaram diferenças significativas (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,426$).

Entre os RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e os RNs a termo também não houve diferenças estatísticas significativas ($p = 0,884$).

Foi detectada diferença significativa na taxa de transferência de anticorpos IgG anti-LPS de *Klebsiella* entre os grupos de RNs pré-termos ≤ 33 semanas e a termo ($p < 0,005$) (**Figura 5**).

Figura 5: Concentrações séricas de IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* (µg/ml) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG anti-LPS de *Klebsiella* (%) (eixo Y direito) nos três grupos. M: amostras de soro materno; RN: amostras de soro de cordão umbilical dos recém-nascidos; s: idade gestacional em semanas.

As concentrações de IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* observadas nos RNs pré-termos e a termo apresentaram correlação com os níveis maternos ($r = 0,8603$, $p < 0,0001$; $r = 0,7434$, $p < 0,0001$, respectivamente).

Foi observada correlação inversa entre níveis de IgG maternos e taxas de transferência apenas no grupo termo ($r = -0,3747$, $p < 0,05$).

4.3.2 Concentrações de IgG anti-LPS de *E. coli* O6

A análise comparativa dos níveis de anticorpos IgG anti-LPS de *E. coli* O6 nas amostras de soro de mães de recém-nascidos pré-termo ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo e a taxa de transferência destes grupos estão representadas na **Tabela 4 e Figura 6**.

Tabela 4. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG anti-LPS de *E. coli* O6 (µg/ml) e das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo.

	Grupo Pt ≤ 33 sem (11)*			Grupo Pt > 33 sem (21)			Grupo Termo (32)		
	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)
Média	0,78	0,41	65,77	0,37	0,30	83,98	0,66	0,66	108,9
Med	0,36	0,36	46,88	0,25	0,2	80,0	0,33	0,31	110,0
DP	0,95	0,41	37,0	0,37	0,35	37,9	1,08	1,21	45,9
Mín	0,2	0,065	32,5	0,08	0,06	18,57	0,064	0,076	37,82
Máx	3,37	1,58	141,6	1,43	1,69	213,3	5,85	6,79	251,0
IC ↓	0,14	0,13	40,8	0,20	0,14	66,6	0,27	0,23	92,4
IC ↑	1,42	0,69	90,6	0,55	0,46	101,2	1,05	1,10	125,5
Teste de Wilcoxon	<i>p < 0,01</i>			<i>p < 0,05</i>			—		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; M: mãe; RN: recém-nascido; T: taxa de transferência; Med: mediana; DP: Desvio padrão; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo; IC ↓ : Intervalo de confiança inferior; IC ↑: Intervalo de confiança superior; — : diferença não significativa.

Figura 6. Concentrações séricas de IgG anti-LPS de *E. coli* O6 ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG anti-LPS de *E. coli* O6 (%) (eixo Y direito) nos três grupos. M: amostras de soro materno; RN: amostras de soro de cordão umbilical dos recém-nascidos; s: idade gestacional em semanas.

Quando comparadas as concentrações de anticorpos anti-LPS de *E. coli* O6 entre mães de recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo, estas não apresentaram diferenças significativas (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,248$), assim como entre seus respectivos RNs também não foram detectadas diferenças significativas ($p = 0,199$).

As taxas de transferência de IgG anti-LPS O6 observadas em RNs pré-termos ≤ 33 semanas, quando comparadas as obtidas em RNs a termo foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), assim como entre recém-nascidos pré-termos > 33 semanas e RNs a termo ($p < 0,05$).

As concentrações de IgG anti-LPS de *E. coli* O6 observadas nos RNs pré-termos e a termo apresentaram correlação com os níveis maternos ($r = 0,8230$, $p < 0,0001$; $r = 0,9249$, $p < 0,0001$, respectivamente).

Foi observada correlação inversa entre níveis de IgG maternos e taxas de transferência apenas no grupo termo ($r = -0,3729$, $p < 0,05$).

4.3.3 Concentrações de IgG anti-LPS de *E. coli* O111

A análise comparativa dos níveis de anticorpos IgG anti- *E. coli* O111 nas amostras de soro de mães de recém- nascidos pré-termo ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo e a taxa de transferência estão representadas na **Tabela 5**.

Tabela 5. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG anti-LPS de *E. coli* O111 ($\mu\text{g/ml}$) e das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo.

	Grupo Pt ≤ 33 sem (11)*			Grupo Pt > 33 sem (21)			Grupo Termo (32)		
	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)
Média	2,59	1,17	49,56	1,80	1,54	87,77	2,85	2,47	99,7
Med	1,81	0,85	36,0	2,06	1,11	87,17	2,18	1,67	90,0
DP	2,13	0,86	26,70	0,86	1,11	43,68	2,23	2,19	42,9
Mín	0,92	0,26	18,18	0,42	0,1	4,65	0,5	0,7	28,3
Máx	8,33	2,93	104,14	3,5	4,15	192,86	9,1	11,75	233,3
IC ↓	1,16	0,59	31,62	1,41	1,03	67,88	2,04	1,68	84,27
IC ↑	4,02	1,75	67,50	2,19	2,05	107,65	3,65	3,26	115,2
Teste de Wilcoxon	$p < 0,01$			—			—		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; M: mãe; RN: recém-nascido; T: taxa de transferência; Med: mediana; DP: Desvio padrão; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo; IC ↓ : Intervalo de confiança inferior; IC ↑: Intervalo de confiança superior; — : diferença não significativa.

Quando comparados os níveis de anticorpos anti-LPS de *E. coli* O111 entre mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de RNs a termo, não foram observadas diferenças significativas (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,436$).

Figura 7. Concentrações séricas de IgG anti-LPS de *E. coli* O111 (µg/ml) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG anti-LPS *E. coli* O111 (%) (eixo Y direito) nos três grupos. M: amostras de soro materno; RN: amostras de soro de cordão umbilical dos recém-nascidos; s: idade gestacional em semanas.

Por outro lado, foram observadas diferenças estatísticas entre os RNs pré-termos ≤ 33 semanas e os RNs a termo ($p < 0,05$).

As taxas de transferência de IgG anti-LPS O111 apresentaram diferenças significativas quando RNs pré-termos ≤ 33 semanas foram comparados aos RNs pré-termos > 33 semanas ($p < 0,05$) e quando RNs pré-

termos ≤ 33 semanas foram comparados aos RNs a termo ($p < 0,01$) (**Figura 7**).

As concentrações de IgG anti-LPS de *E. coli* O111 observadas nos RNs pré-termos e a termo apresentaram correlação com os níveis maternos ($r = 0,6571$, $p < 0,001$; $r = 0,6777$, $p < 0,001$, respectivamente). Foi observada correlação entre a taxa de transferência e níveis de IgG anti-LPS O111 no RN pré-termo ($r = 0,5284$, $p < 0,01$).

Foi observada correlação inversa entre níveis de IgG maternos e taxas de transferência apenas no grupo termo ($r = -0,7207$, $p < 0,001$).

4.3.4 Concentrações de IgG anti-LPS de *E. coli* O26

A análise dos níveis de anticorpos IgG anti-LPS de *E. coli* O26 nas amostras de soro de mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de RNs a termo e a taxa de transferência de anticorpos IgG anti-LPS O26 estão representadas na **Tabela 6**.

Tabela 6. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG anti-LPS de *E. coli* O26 ($\mu\text{g/ml}$) e das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo.

	Grupo Pt ≤ 33 sem (11)*			Grupo Pt > 33 sem (21)			Grupo Termo (32)		
	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)
Média	2,71	1,83	70,9	1,5	0,76	61,6	2,6	1,9	96,7
Med	1,4	0,93	69,0	1,38	0,46	57,1	1,5	1,1	92,3
DP	2,24	1,77	36,0	1,2	0,8	38,9	4,6	2,35	33,6
Mín	0,5	0,1	17,03	0,08	0,08	7,0	0,14	0,22	39,1
Máx	5,8	4,8	128,74	5,0	3,1	162,5	25,6	10,0	181,4
IC ↓	1,20	0,64	46,7	0,93	0,4	43,9	1,0	1,1	84,6
IC ↑	4,21	3,03	95,1	2,05	1,12	79,3	4,3	2,8	108,8
Teste Kruskal-Wallis	$p < 0,05$			$p < 0,01$			—		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; M: mãe; RN: recém-nascido; T: taxa de transferência; Med: mediana; DP: Desvio padrão; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo; IC ↓ : Intervalo de confiança inferior; IC ↑ : Intervalo de confiança superior; — : diferença não significativa.

Quando comparados os níveis de anticorpos anti-LPS O26 entre mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de RNs a termo estes não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,439$).

Foram observadas diferenças significativas entre os RNs pré-termos > 33 semanas e os RNs a termo ($p < 0,05$).

As taxas de transferência também apresentaram diferenças estatísticas entre os RNs pré-termos > 33 semanas e RNs a termo ($p < 0,05$) (**Figura 8**).

Figura 8. Concentrações séricas de IgG anti-LPS de *E. coli* O26 (µg/ml) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG anti-LPS de *E. coli* O26 (%) (eixo Y direito) nos três grupos. M: amostras de soro materno; RN: amostras de soro de cordão umbilical dos recém-nascidos; s: idade gestacional em semanas.

As concentrações de IgG anti-LPS de *E. coli* O26 observadas nos RNs pré-termos e a termo apresentaram correlação com os níveis maternos ($r = 0,8516$, $p < 0,0001$; $r = 0,9359$, $p < 0,0001$, respectivamente).

Foi observada correlação inversa entre níveis de IgG maternos e taxas de transferência apenas no grupo termo ($r = -0,6107$, $p < 0,001$).

4.3.5 Concentrações de IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*

A análise dos níveis de anticorpos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras de soro de mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33semanas e de RNs a termo e as taxas de transferência destes grupos estão representadas na **Tabela 7**.

Tabela 7. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (µg/ml) e das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo.

	Grupo Pt ≤ 33 sem (11)*			Grupo Pt > 33 sem (21)			Grupo Termo (32)		
	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)
Média	0,33	0,34	106,20	0,39	0,33	100,0	0,38	0,52	163,4
Med	0,24	0,28	91,57	0,33	0,21	85,71	0,27	0,41	128,9
DP	0,21	0,23	43,6	0,27	0,26	93,8	0,46	0,41	79,5
Mín	0,1	0,1	46,51	0,16	0,05	18,18	0,1	0,12	50,0
Máx	0,83	0,76	180,0	1,3	1,2	475,0	2,8	1,9	373,3
IC ↓	0,18	0,18	76,87	0,27	0,21	57,27	0,21	0,37	134,7
IC ↑	0,47	0,49	135,54	0,52	0,45	142,72	0,55	0,67	192,1
Teste de Wilcoxon	—			—			<i>p</i> < 0,001		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; M: mãe; RN: recém-nascido; T: taxa de transferência; Med: mediana; DP: Desvio padrão; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo; IC ↓ : Intervalo de confiança inferior; IC ↑: Intervalo de confiança superior; — : diferença não significativa.

Os níveis de anticorpos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* observados em mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e em mães de RNs a termo não apresentaram diferenças significativas (Teste Kruskal-Wallis, *p* = 0,649). Apenas os RNs pré-termos > 33 semanas apresentaram diferença significativa nos níveis de IgG anti-LPS de *P. aeruginosa* quando comparados aos RNs a termo (*p* < 0,05).

Por outro lado, as taxas de transferência destes anticorpos foram estatisticamente diferentes entre RNs pré-termos ≤ 33 semanas e RNs a

termo ($p < 0,05$), assim como entre pré-termos > 33 semanas e RNs a termo ($p < 0,05$) (**Figura 9**).

Figura 9. Concentrações séricas de IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo (eixo Y esquerdo) e taxas de transferência de IgG anti-LPS de *Pseudomonas* (%) (eixo Y direito) nos três grupos. M: amostras de soro materno; RN: amostras de soro de cordão umbilical dos recém-nascidos; s: idade gestacional em semanas.

As concentrações de IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* observadas nos RNs pré-termos e a termo apresentaram correlação com os níveis maternos ($r = 0,4530$, $p < 0,05$; $r = 0,7280$, $p < 0,001$, respectivamente). Foi observada correlação entre as taxas de transferência e níveis de IgG no RN pré-termo ($r = 0,5694$, $p < 0,05$). A Correlação inversa foi observada entre níveis de IgG maternos e taxas de transferência apenas no grupo pré-termo ($r = -0,3765$, $p < 0,05$).

4.4 Concentrações totais de IgM sérica

A análise dos níveis totais de anticorpos IgM nas amostras de soro materno do grupo de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de RNs a termo está representada na **Tabela 8**, e demonstra que não existe diferença significativa entre os três grupos (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,752$) (**Figura 10**).

Tabela 8. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM séricos totais em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo.

IgM sérica total (mg/dl)			
	Mães de Pt ≤ 33 sem (11)*	Mães de Pt > 33 sem (18)	Mães de Termo (32)
Média	194,81	147,22	178,65
Mediana	160,0	145,0	146,0
DP	144,60	55,58	113,45
Mínimo	64,0	60,0	55,0
Máximo	598,0	250,0	645,0
IC Inferior	97,67	119,57	137,75
IC Superior	291,9	174,86	219,56
Teste de Kruskal-Wallis	$p = 0,752$		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; sem: semanas; DP: Desvio padrão; IC: Intervalo de confiança.

Figura 10. Concentrações séricas de IgM total (mg/dl) em amostras de soro materno dos grupos de recém-nascidos ≤ 33 semanas, pré-termos > 33 semanas e a termo. s: idade gestacional em semanas.

4.5 Dosagem de Anticorpos IgM Específicos

4.5.1 Concentrações de IgM anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*

A análise estatística descritiva dos níveis de anticorpos IgM anti-LPS de *Klebsiella* das amostras de soro das mães dos dois grupos de pré-termos e das mães do grupo de termo está representada na **Tabela 9**, sendo que entre os mesmos não ocorreram diferenças significativas (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,846$).

Tabela 9. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo.

IgM anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ($\mu\text{g/ml}$)			
	Mães de Pt ≤ 33 sem (11)*	Mães de Pt > 33 sem (18)	Mães de Termo (32)
Média	5,82	5,04	5,58
Mediana	4,56	4,42	4,63
DP	3,95	4,15	5,17
Mínimo	1,8	0,1	1,6
Máximo	14,33	15,3	32,0
IC Inferior	3,16	2,98	3,71
IC Superior	8,47	7,11	7,44
Teste de Kruskal-Wallis	$p = 0,846$		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; sem: semanas; DP: Desvio padrão; IC: Intervalo de confiança.

4.5.2 Concentrações de IgM anti-LPS de *E. coli* O6

A análise dos níveis de anticorpos IgM anti-LPS de *E. coli* O6 nas amostras de soro de mães de recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e de recém-nascidos a termo está representada na **Tabela 10**, sendo que entre estes grupos não ocorreram diferenças significativas (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,729$).

Tabela 10. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de *E. coli* O6 em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo.

IgM anti-LPS de <i>E. coli</i> O6 ($\mu\text{g/ml}$)			
	Mães de Pt ≤ 33 sem (11)*	Mães de Pt > 33 sem (18)	Mães de Termo (32)
Média	12,17	11,95	14,43
Mediana	10,8	8,63	11,12
DP	7,78	10,02	12,49
Mínimo	2,98	0,46	3,04
Máximo	31,59	38,98	53,42
IC Inferior	6,94	6,97	9,93
IC Superior	17,40	16,94	18,94
Teste de Kruskal-Wallis	$p = 0,729$		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; sem: semanas; DP: Desvio padrão; IC: Intervalo de confiança.

4.5.3 Concentrações de IgM anti-LPS de *E. coli* O111

A análise dos níveis de anticorpos IgM anti-LPS de *E. coli* O111 das amostras de soro de mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e de RNs a termo está representada na **Tabela 11**, sendo que entre as mesmas não ocorreram diferenças estatísticas significativas (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,879$).

Tabela 11. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de *E. coli* O111 em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo.

IgM anti-LPS de <i>E. coli</i> O111 ($\mu\text{g/ml}$)			
	Mães de Pt ≤ 33 sem (11)*	Mães de Pt > 33 sem (18)	Mães de Termo (32)
Média	30,92	21,37	22,0
Mediana	20,0	20,59	17,68
DP	30,59	13,58	15,74
Mínimo	7,23	0,1	5,98
Máximo	105,12	45,05	72,12
IC Inferior	10,36	14,62	16,32
IC Superior	51,47	28,12	27,67
Teste de Kruskal-Wallis	$p = 0,879$		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; sem: semanas; DP: Desvio padrão; IC: Intervalo de confiança.

4.5.4 Concentrações de IgM anti-LPS de *E. coli* O26

A análise comparativa dos níveis de anticorpos IgM anti-LPS de *E. coli* O26 nas amostras de soro de mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e de RNs a termo está representada na **Tabela 12**, sendo que entre os três grupos não ocorreram diferenças significativas (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,439$).

Tabela 12. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de *E. coli* O26 em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo.

IgM anti-LPS de <i>E. coli</i> O26 ($\mu\text{g/ml}$)			
	Mães de Pt ≤ 33 sem (11)*	Mães de Pt > 33 sem (18)	Mães de Termo (32)
Média	5,24	3,0	3,81
Mediana	4,02	2,94	2,94
DP	3,94	1,63	3,91
Mínimo	0,98	0,16	0,77
Máximo	12,45	5,96	22,8
IC Inferior	2,59	2,19	2,40
IC Superior	7,89	3,18	5,22
Teste de Kruskal-Wallis	$p = 0,439$		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; sem: semanas; DP: Desvio padrão; IC: Intervalo de confiança.

4.5.5 Concentrações de IgM anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*

A análise dos níveis de anticorpos IgM anti-LPS de *Pseudomonas* nas amostras de soro de mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e de RNs a termo está representada na **Tabela 13**, sendo que entre os mesmos não ocorreu diferença estatística significativa (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,652$).

Tabela 13. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de soro das mães de recém-nascidos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de recém-nascidos a termo.

IgM anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ($\mu\text{g/ml}$)			
	Mães de Pt ≤ 33 sem (11)*	Mães de Pt > 33 sem (18)	Mães de Termo (32)
Média	7,23	5,49	5,50
Mediana	4,82	4,69	4,75
DP	5,38	3,61	2,71
Mínimo	2,48	0,87	1,41
Máximo	20,92	13,23	11,24
IC Inferior	3,61	3,69	4,52
IC Superior	10,85	7,28	6,48
Teste de Kruskal-Wallis	$p = 0,652$		

*: número de amostras em cada grupo; Pt: grupo de pré-termos; sem: semanas; DP: Desvio padrão; IC: Intervalo de confiança.

Figura 11. Concentrações séricas de IgM anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*, anti-LPS de *E. coli* O6, O111 e O26 e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (µg/ml) em amostras de soro materno do grupo de recém-nascidos pré-termos com idade gestacional ≤ 33 semanas, > 33 semanas e a termo. s: idade gestacional em semanas; T: termo.

A análise realizada pelo teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas nos níveis de IgM entre os diferentes grupos reativos com os diferentes LPS ($p < 0,0001$) (**Figura 11**). O teste de comparações múltiplas demonstrou concentrações mais elevadas especificamente de IgM anti-LPS O111 para os 3 subgrupos estudados quando comparados aos níveis de IgM anti-LPS de *Klebsiella*, anti-LPS O26 e anti-LPS de *Pseudomonas* dos grupos com idades gestacionais equivalentes ($p < 0,05$). Também foram detectados níveis de IgM anti-LPS O6 mais elevados no grupo termo quando comparados aos níveis de IgM anti-LPS de *Klebsiella*, anti-LPS O26 e anti-LPS de *Pseudomonas* também do grupo termo.

A comparação das concentrações entre IgM e IgG anti-LPS reativos com todos os LPS nas amostras de soro de mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e mães de RNs a termo, realizada pelo Teste de Kruskal-Wallis, nos revelou níveis significativamente mais altos de IgM específico ($p < 0,0001$).

Foram observadas correlações altamente significativas quando as concentrações de anticorpos IgM reativos com todos os LPS foram comparadas entre si e também com as concentrações de IgM total, tanto nas mães de RNs pré-termos, quanto nas mães de RNs a termo. Os índices de correlação variaram de 0,4917 a 0,8404 para mães de RNs a termo, com valores de p altamente significativos ($p < 0,01$), e variaram entre 0,4410 e 0,8586 para mães de RNs pré-termos ($p < 0,05$), sendo os maiores índices observados para *Pseudomonas*, em ambos os casos.

Quanto aos níveis de IgG específicos reativos com todos os LPS, ao serem comparados entre si, nas amostras maternas e nas amostras dos neonatos dos grupos pré-termo e termo, também foram encontrados índices de correlação significativos, porém apenas entre alguns LPS e com valores de correlação mais baixos.

4.6 Análise do Efeito das Patologias Sobre os Níveis de Anticorpos Maternos, Neonatais e Taxas de Transferência

No grupo de mães de recém-nascidos pré-termos e a termo foram detectadas patologias de base ou intercorrências ocorridas durante o parto, que estão descritas em anexo (**Anexo 1, Tabela 1**).

4.6.1 Comparação das concentrações de anticorpos entre mães COM E SEM PATOLOGIAS do grupo de PRÉ-TERMOS

Foi realizada uma análise estatística na qual as amostras pareadas de mães e RNs pré-termos foram divididas em dois subgrupos: o primeiro foi constituído por 15 amostras de soro materno e 15 amostras de soro de seus respectivos RNs provenientes de mães com patologias e o segundo grupo foi constituído por 14 amostras de soro materno e 17 amostras de soro de seus respectivos RNs provenientes de mães sem patologias (1 grupo de gêmeos e um de trigêmeos).

A análise dos níveis de IgG totais e específicos para os LPS de *Klebsiella pneumoniae*, de *E. coli* O6, O111 e O26 e de *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras de soro materno e amostras de soro de seus respectivos recém-nascidos pré-termos demonstrou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com e sem patologias.

A análise das taxas de transferência de anticorpos IgG totais e específicos também não revelou diferenças significativas entre os grupos de pré-termos, com e sem patologias.

Por outro lado, a análise das concentrações de anticorpos IgM totais e específicos para os diferentes LPS realizada no grupo de mães de pré-termos com e sem patologias revelou várias diferenças estatísticas significativas, que estão representadas na **Tabela 14**. Com exceção dos níveis de IgM anti-LPS O6, que não foram estatisticamente diferentes entre os dois subgrupos, em todos os casos as amostras de soro de mães sem patologias apresentaram níveis significativamente mais altos.

Tabela 14. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM totais (mg/dl) e específicos (µg/ml) em amostras de soro das mães de recém-nascidos pré-termos **com** e **sem patologias**.

	IgM total		IgM anti-LPS <i>Klebsiella</i>		IgM anti-LPS O111		IgM anti-LPS O26		IgM anti-LPS <i>Pseudomonas</i>	
	Com (15)*	Sem (14)	Com (15)	Sem (14)	Com (15)	Sem (14)	Com (15)	Sem (14)	Com (15)	Sem (14)
Média	124,9	208,6	3,3	7,5	13,9	36,9	2,4	5,4	3,6	8,9
Mediana	114,0	182,0	3,0	5,2	14,8	31,8	2,3	4,2	3,5	7,6
DP	57,3	117,8	2,2	4,4	9,0	25,0	1,6	3,2	2,1	4,6
Mínimo	60,0	129,0	0,1	2,8	0,1	11,34	0,16	2,02	0,87	3,68
Máximo	250,0	598,0	8,3	15,3	32,36	105,1	5,96	12,45	9,03	20,92
Teste de Mann-Whitney	<i>p</i> = 0,005		<i>p</i> = 0,005		<i>p</i> = 0,0009		<i>p</i> = 0,003		<i>p</i> = 0,0002	

*: número de amostras em cada grupo; Com: com patologias; Sem: sem patologias; DP: Desvio padrão.

Figura 12. Concentrações de anticorpos IgM totais (mg/dl) (eixo Y direito) e anticorpos IgM anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*, anti-LPS de *E. coli* O111 e O26 e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (µg/ml) (eixo Y esquerdo) em amostras de soro das mães de recém-nascidos pré-**termos com** e **sem patologias**. Com: mães com patologias; Sem: mães sem patologias.

4.6.2 Comparação das concentrações de anticorpos entre mães **COM E SEM PATOLOGIAS** do grupo de **TERMO**

Para realizar a análise, as amostras pareadas de mães e RNs a termo também foram divididas em dois subgrupos: o primeiro foi constituído por 16 amostras de soro materno e de seus respectivos RNs provenientes de mães com patologias e o segundo grupo foi constituído por 16 amostras de soro materno e de seus respectivos RNs provenientes de mães sem patologias.

A análise dos níveis de IgG totais e específicos para todos os LPS nas amostras de soro materno e nas amostras de soro de seus respectivos

recém-nascidos a termo demonstrou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com e sem patologias.

A análise das taxas de transferência de anticorpos IgG totais e específicos entre os dois subgrupos, com e sem patologias, revelou diferenças significativas apenas para o LPS O111 ($p < 0,05$).

A análise dos anticorpos IgM totais e específicos para os diferentes LPS realizada no grupo de mães de RNs a termo com e sem patologias também não revelou concentrações estatisticamente diferentes entre os dois subgrupos.

4.6.3 Análise das concentrações de anticorpos entre os grupos TERMO E PRÉ-TERMO de mães SEM PATOLOGIAS

Quando os níveis séricos totais de anticorpos IgG e níveis de anticorpos IgG específicos para todos os LPS foram comparados entre as mães de recém-nascidos a termo e as mães de pré-termos, sem patologias, não foram detectadas diferenças estatísticas significativas.

Por outro lado, foram detectadas concentrações significativamente mais baixas de IgG sérica total e de IgG anti-LPS O6 nas amostras de RNs pré-termos quando comparados aos RNs a termo, ambos de mães sem patologias.

A análise das taxas de transferência de anticorpos IgG revelou diferenças significativas entre os grupos de pré-termos e a termo de mães sem patologias para os LPS de *Klebsiella pneumoniae*, de *E. coli* O6, O111 e O26 e *Pseudomonas aeruginosa* (**Tabelas 15**). Por outro lado, a análise das taxas de transferência de anticorpos IgG totais não revelou diferença entre os grupos.

Tabela 15. Análise estatística descritiva das concentrações séricas de IgG total (mg/dl) e IgG anti-LPS (µg/ml) em amostras de soro de recém-nascidos a termo e pré-termos do subgrupo **sem patologias**.

	IgG total		IgG anti-LPS <i>Klebsiella</i>		IgG anti-LPS O6		IgG anti-LPS O111		IgG anti-LPS O26		IgG anti-LPS <i>Pseudomonas</i>	
	RN T (16)*	RN PT (17)	RN T (16)	RN PT (17)	RN T (16)	RN PT (17)	RN T (16)	RN PT (17)	RN T (16)	RN PT (17)	RN T (16)	RN PT (17)
Méd	1061,3	640,6	0,80	0,68	0,60	0,31	2,7	1,57	1,37	1,21	0,56	0,37
Med	1141,5	620,0	0,68	0,62	0,44	0,16	1,6	1,11	0,83	0,52	0,41	0,25
DP	253,1	272,0	0,45	0,41	0,56	0,36	2,7	1,2	1,20	1,47	0,46	0,29
Mí	431,0	207,0	0,2	0,15	0,07	0,06	0,7	0,26	0,22	0,1	0,2	0,1
Máx	1381,0	1230	1,9	1,65	2,36	1,58	11,7	4,15	4,6	4,8	1,9	1,2
Teste	<i>p</i> = 0,0003		<i>p</i> = 0,438		<i>p</i> = 0,0349		<i>p</i> = 0,090		<i>p</i> = 0,271		<i>p</i> = 0,164	

*: número de amostras em cada grupo; RN T: recém-nascido a termo; RN PT: recém-nascido pré-termo; Méd: Média; Med: Mediana; DP: Desvio padrão; Mín: Mínimo; Máx: Máximo; Teste: Teste de Mann-Whitney.

Figura 13. Concentrações de anticorpos IgG totais (mg/dl) (eixo Y esquerdo) e anticorpos IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*, anti-LPS de *E. coli* O6, O111 e O26 e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (µg/ml) (eixo Y direito) em amostras de soro de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termos e a termo do subgrupo **sem patologias**. PT: recém-nascido pré-termo; T: recém-nascido a termo.

Tabela 16. Análise estatística descritiva das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro de recém-nascidos a termo e pré-termos do subgrupo **sem patologias**.

	IgG total		IgG anti-LPS <i>Klebsiella</i>		IgG anti-LPS O6		IgG anti-LPS O111		IgG anti-LPS O26		IgG anti-LPS <i>Pseudomonas</i>	
	RN T (16)*	RN PT (17)	RN T (16)	RN PT (17)	RN T (16)	RN PT (17)	RN T (16)	RN PT (17)	RN T (16)	RN PT (17)	RN T (16)	RN PT (17)
Méd	128,9	102,8	115,6	79,6	119,0	67,1	111,9	74,6	99,8	61,0	175,9	90,5
Med	125,7	89,0	97,3	79,1	110,1	70,4	112,2	73,9	92,2	59,3	177,5	91,6
DP	30,3	53,5	63,5	30,9	57,2	24,6	38,9	40,8	31,3	38,7	73,8	37,5
Mín	76,0	28,9	60,4	16,5	37,8	32,5	49,2	18,2	58,3	7,0	91,1	18,2
Máx	185,4	209,9	325,0	135,0	251,1	114,7	173,8	164,0	164,3	129,2	316,7	175,0
Teste	$p = 0,0635$		$p = 0,0418$		$p = 0,0006$		$p = 0,0123$		$p = 0,0122$		$p = 0,0003$	

*: número de amostras em cada grupo; RN T: recém-nascido a termo; RN PT: recém-nascido pré-termo; Méd: Média; Med: Mediana; DP: Desvio padrão; Mín: Mínimo; Máx: Máximo; Teste: Teste de Mann-Whitney.

Figura 14. Taxas de transferência de anticorpos IgG totais e específicos para o LPS de *Klebsiella pneumoniae*, de *E. coli* O6, O111 e O26 e de *Pseudomonas aeruginosa* (%) em amostras de soro de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termos e a termo do subgrupo **sem patologias**. PT: recém-nascido pré-termo; T: recém-nascido a termo.

A análise dos anticorpos IgM séricos totais e específicos em mães de RNs a termo e de pré-termos, sem patologias, demonstrou níveis significativamente mais altos de IgM anti-LPS de *E. coli* O111, O26 e *Pseudomonas aeruginosa* nas mães de RNs pré-termos (**Tabela 17**). Os níveis séricos de IgM total e IgM anti-LPS de *Klebsiella* e de O6 não mostraram diferenças significativas (dados não mostrados).

Tabela 17. Análise estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de O111, O26 e de *Pseudomonas aeruginosa* ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro das mães de recém-nascidos a termo e pré-termos do subgrupo **sem patologias**.

	IgM anti-LPS O111		IgM anti-LPS O26		IgM anti-LPS <i>Pseudomonas</i>	
	M	T (16)*	M	PT (14)	M	PT (14)
Média	21,3	36,9	3,2	5,4	5,3	8,9
Mediana	17,3	31,8	2,9	4,2	4,8	7,6
DP	3,7	25,0	1,8	3,2	2,2	4,6
Mínimo	6,0	11,3	0,8	2,0	1,4	3,7
Máximo	46,4	105,1	6,7	12,4	8,7	20,9
Teste Mann-Whitney	$p = 0,048$		$p = 0,039$		$p = 0,016$	

*: número de amostras em cada grupo; RN T: recém-nascido a termo; RN PT: recém-nascido pré-termo; DP: Desvio padrão.

Figura 15. Concentrações de anticorpos IgM anti-LPS de *E. coli* O111 e O26 e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* ($\mu\text{g/ml}$) em amostras de soro das mães de recém-nascidos pré-termos e a termo **sem patologias**. PT: recém-nascido pré-termo; T: recém-nascido a termo.

4.6.4 Análise das concentrações de anticorpos entre os grupos TERMO E PRÉ-TERMO de mães COM PATOLOGIAS

Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas nos níveis séricos totais de anticorpos IgG e níveis de anticorpos IgG específicos para todos os LPS entre as mães de recém-nascidos a termo e mães de pré-termos com patologias.

Foram detectadas concentrações significativamente mais baixas de IgG sérica total, de IgG anti-LPS O26 e de IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de RNs pré-termos quando comparados aos RNs a termo, ambos do subgrupo de mães com patologias (**Tabela 18 e Figura 16**).

A análise das taxas de transferência de anticorpos IgG revelou diferença significativa entre o grupo de pré-termos e de termo de mães com patologias apenas para IgG total, porém não foi observada diferença significativa nas taxas de transferência de anticorpos IgG anti-LPS de *E. coli* O26 e *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 18. Análise estatística descritiva das concentrações séricas de IgG total (mg/dl) e IgG anti-LPS (µg/ml) em amostras de soro de recém-nascidos a termo e pré-termos do subgrupo **com patologias**.

	IgG total		IgG anti-LPS O26		IgG anti-LPS <i>Pseudomonas</i>	
	RN T (16)*	RN PT (15)	RN T (16)	RN PT (15)	RN T (16)	RN PT (15)
Média	1059,4	644,7	2,5	1,0	0,5	0,3
Mediana	1010,5	756,0	1,5	0,55	0,4	0,2
DP	196,0	281,0	3,05	1,1	0,4	0,2
Mínimo	787,0	134,0	0,4	0,08	0,1	0,05
Máximo	1428,0	1052,0	10,0	4,0	1,4	0,8
Teste	<i>p</i> = 0,0002		<i>p</i> = 0,045		<i>p</i> = 0,041	

*: número de amostras em cada grupo; RN T: recém-nascido a termo; RN PT: recém-nascido pré-termo; DP: Desvio padrão; Teste: Teste de Mann-Whitney.

Figura 16. Concentrações de anticorpos IgG totais (mg/dl) (eixo Y esquerdo) e anticorpos IgG anti-LPS de *E. coli* O26 e de *Pseudomonas aeruginosa* (µg/ml) (eixo Y direito) em amostras de soro de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termos e a termo do subgrupo **com patologias**. PT: recém-nascido pré-termo; T: recém-nascido a termo.

Tabela 19. Análise estatística descritiva das taxas de transferência de IgG (%) em amostras de soro de recém-nascidos a termo e pré-termos do subgrupo **com patologias**.

	IgG total		IgG anti-LPS O26		IgG anti-LPS <i>Pseudomonas</i>	
	RN T (16)*	RN PT (15)	RN T (16)	RN PT (15)	RN T (16)	RN PT (15)
Média	119,9	111,4	93,6	69,2	150,9	115,3
Mediana	111,1	84,2	92,3	63,2	125,0	85,7
DP	27,7	88,0	36,5	37,2	85,5	109,6
Mínimo	87,05	12,55	39,1	17,0	50,0	25,0
Máximo	198,2	374,2	181,4	162,5	373,3	475,0
Teste de Mann-Whitney	<i>p</i> = 0,041		<i>p</i> = 0,055		<i>p</i> = 0,055	

*: número de amostras em cada grupo; RN T: recém-nascido a termo; RN PT: recém-nascido pré-termo; DP: Desvio padrão.

Figura 17. Taxas de transferência de anticorpos IgG totais e específicos para LPS de *E. coli* O26 e para LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (%) em amostras de soro de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termos e a termo do subgrupo **com patologias**. PT: recém-nascido pré-termo; T: recém-nascido a termo.

A análise dos anticorpos IgM totais e específicos para os diferentes LPS realizada nas amostras de mães de RNs pré-termos e de RNs a termo com patologias também não revelou concentrações estatisticamente diferentes entre os dois grupos.

As três tabelas com os grupos de pré-termo ≤ 33 semanas, > 33 semanas e grupo de termo ≥ 37 semanas com todos os dados do grupo amostral deste trabalho estão nos **Anexos 3, 4 e 5**.

As três tabelas com os grupos de pré-termo ≤ 33 semanas, > 33 semanas e grupo de termo ≥ 37 semanas com todos os dados do grupo amostral deste trabalho estão nos **Anexos 3, 4 e 5**.

5 DISCUSSÃO

A realidade adversa pela qual passam os recém-nascidos pré-termos difere dos recém-nascidos a termo quanto ao tempo e a ordem de colonização da microbiota do trato gastrointestinal, sendo esta condição associada à imaturidade do sistema imune, o que aumenta as chances de infecções sistêmicas, podendo levar a sepse neonatal.

Nos países em desenvolvimento, doenças infecciosas estão associadas com substancial morbidade e mortalidade em pré-termos e, mais particularmente, em pré-termos com baixo peso (World Health Organization - WHO, 2006).

A microbiota intestinal é importante tanto para as funções metabólicas, como para a defesa contra infecções bacterianas que podem acometer o neonato. No momento do nascimento e logo após, a microbiota do trato genital materno e do ambiente imediato colonizam o trato gastrointestinal do infante até que a densa e complexa comunidade bacteriana seja estabelecida.

As bactérias anaeróbicas como bifidobactérias e lactobacilos que compõem a microbiota intestinal favorecem a sua proteção, em virtude do seu poder de supressão sobre as bactérias patogênicas.

Nos RNs a termo que são amamentados encontram-se um grande número de bifidobactérias e lactobacilos. Os neonatos pré-termos possuem um padrão de colonização pela microbiota diferente dos RNs a termo (Dai e Walker, 1990). O grupo de bifidobactérias torna-se dominante no quarto dia pós-nascimento em RNs a termo e, em contrapartida, leva vinte dias no grupo de pré-termos com baixo peso ao nascimento (Westerbeek, et al., 2006). Segundo Hall e colaboradores (1990), a significativa baixa prevalência de colonização por lactobacilos no grupo de pré-termos com até 30 dias de vida, evidencia baixos números de bactérias benéficas na

microbiota intestinal deste grupo, tornando-os ainda mais susceptíveis a infecções.

Estas características combinadas a um aumento da permeabilidade intestinal podem conduzir a translocação bacteriana para outros tecidos e órgãos, aumentando o risco de infecções sistêmicas, já que bactérias potencialmente patogênicas apresentam uma maior capacidade de translocar-se (Westerbeek, et al., 2006).

As estimativas de taxas de infecções neonatais ficam em torno de 18 a 130 mortes para cada 1.000 nascidos vivos, onde estão envolvidas infecções como gastroenterites, pneumonias, onfalites, flebites e infecções do trato urinário (Zaidi, et al., 1991; Kaushik, et al., 1998; Rajab, 1990).

Diante da importância da aquisição de anticorpos maternos, que provêm proteção no início da vida, no presente trabalho, avaliamos a transmissão transplacentária de imunoglobulinas totais do isotipo IgG em recém-nascidos a termo e pré-termos, e de anticorpos IgG reativos com LPS de *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* O6, O111, O26 e *Pseudomonas aeruginosa*, seja por sua prevalência em infecções neonatais sistêmicas, seja por sua associação com infecções gastrintestinais.

Levando-se em consideração que a passagem de anticorpos se torna mais intensificada por volta da 30^a a 34^a semanas de gestação (Landor, et al., 1995; Longsworth, et al., 1945; Kohler, et al., 1966), foi de extrema relevância uma distribuição mais equitativa do nosso grupo amostral, embora exista uma disparidade entre o número de RNs distribuídos entre as diferentes faixas etárias. Sendo assim, subdividimos o grupo de pré-termos entre: pré-termos $\leq$ 33 semanas, $>$ 33 semanas e comparamos com o grupo de termos $\geq$ 37 semanas.

Como primeiro passo para o entendimento do processo de transferência do repertório de anticorpos da mãe para o seu filho, foi realizada uma análise dos níveis séricos de IgG total em soro materno e de

cordão umbilical do seu respectivo RN. Foram observados níveis equivalentes entre as mães pertencentes aos diferentes grupos; níveis equivalentes entre as mães e seus respectivos RNs pré-termos dos dois grupos, porém níveis superiores dos RNs a termo quando comparados às suas mães e aos RNs pré-termos ≤ 33 semanas e > 33 semanas.

A avaliação das taxas de transferência também mostrou valores crescentes em função do aumento da idade gestacional, até atingir o termo. Segundo Mussi-Pinhata e Rego (2005), o transporte ativo de IgG através da placenta inicia-se precocemente e vai aumentando proporcionalmente até o termo gestacional, mostrando que a idade gestacional influencia nos níveis de IgG total do cordão umbilical. Além disso, estão descritos níveis entre 10 e 20% maiores de IgG total em RNs a termo quando comparados às suas respectivas mães. A mediana dos níveis de IgG total detectada nos neonatos a termo, no presente trabalho, foi exatamente 20% superior aos níveis maternos. Estes resultados estão de acordo com diversos trabalhos na literatura (Salimonu, et al., 1978; Carvalho, et al., 1988; Nagao, et al., 1999 e 2001).

Foram estabelecidas correlações entre os níveis de anticorpos IgG reativos para todos os LPS estudados nos RNs pré-termos e a termo quando comparados às suas respectivas mães, o que só vem a confirmar a relação estreita entre os níveis de anticorpos maternos com os níveis neonatais, tanto no grupo a termo como no grupo pré-termo.

Uma observação importante surgiu das análises feitas comparando-se os níveis de IgG totais e específicos maternos com as taxas de transferência destes anticorpos. Correlações inversas foram estabelecidas no grupo a termo, para IgG total e todos os LPS, mas somente para IgG total e para *Pseudomonas* no grupo pré-termo, provavelmente decorrente de uma maior variabilidade dos resultados. Estes resultados demonstram que quanto menores os níveis de IgG maternos, maiores são as taxas de

transferência destes anticorpos, sugerindo uma potencialização da passagem transplacentária.

Com o objetivo de realizar uma análise mais detalhada do nosso grupo amostral, desconsiderando o critério idade gestacional, todas as amostras foram agrupadas de acordo com os níveis de anticorpos específicos, o que proporcionou um aumento do número amostral para realizar esta análise, e foram reveladas correlações inversas significativas entre os níveis de IgG maternos e taxas de transferência para cada LPS estudado (dados não mostrados).

Para confirmar os resultados acima citados, agrupamos todas as concentrações de IgG reativas com todos os LPS das amostras de soro materno, também desconsiderando o critério idade gestacional. Este agrupamento proporcionou um aumento no número de resultados para a análise de correlação ($n = 320$ amostras) e revelou correlação inversa altamente significativa entre anticorpos IgG específicos e taxas de transferência ($r = -0,3852$, $p < 0,0001$).

Estes dados confirmam as evidências experimentais de Brambell, et al. (1958), nas quais altos níveis de anticorpos são degradados pela saturação dos receptores FcRn, e também demonstra mais um mecanismo de proteção ao neonato pela acentuação da transmissão dos anticorpos quando estes não estão em níveis considerados protetores.

Como um exemplo de destaque em nosso grupo amostral temos, entre outras, a amostra de nº 7 que apresentou níveis séricos totais de IgG de 151 mg/dl no soro materno, o que pode indicar uma imunodeficiência humoral, e uma taxa de transferência destes anticorpos de 374,2% para o seu RN pré-termo (33 3/7 semanas). Além dos níveis de IgG total, as taxas de transferência de anticorpos IgG específicos foram as maiores encontradas dentre o grupo de pré-termos com idade gestacional entre 33 e 37 semanas.

Confirmando o que mencionamos acima, Kohler e Farr (1966), encontraram, em média, mais anticorpos IgG no soro de cordão umbilical de recém-nascidos que no soro de suas respectivas mães, o que foi confirmado no mesmo ano por Michaux, et al., (1966), o qual esclarece afirmando que o transporte de IgG foi ativo quando os níveis séricos maternos de IgG total eram baixos ou dentro da faixa de normalidade. Quando os níveis de IgG eram elevados, a concentração de IgG do cordão tendia a ser mais baixa que os níveis maternos correspondentes (De Moraes-Pinto, et al., 2001). Outros estudos também demonstraram que a eficiência da transmissão de anticorpos específicos diminui à medida que o nível materno desses anticorpos aumenta (Englund, et al., 1995; De Moraes-Pinto, et al., 1996; Mäntyjärvi, et al., 1970).

Um dos objetivos do nosso trabalho consistiu na avaliação de anticorpos IgM no soro de mães de recém-nascidos a termo e pré-termos para os mesmos LPS e, de forma complementar, avaliamos também os níveis séricos totais de IgM nas mesmas amostras.

Não houve diferenças estatísticas significativas nos níveis séricos totais de IgM nas amostras de soro de mães de RNs pré-termos ≤ 33 semanas, > 33 semanas e a termo, sendo o mesmo observado nos resultados de anticorpos IgM específicos para todos os LPS analisados neste estudo.

Embora não tenham sido observadas diferenças nas concentrações de IgM total e anti-LPS entre as mães dos 3 subgrupos, destacaram-se os altos níveis de IgM anti-LPS O111 nos 3 subgrupos estudados que, de modo geral, foram maiores em comparação aos outros LPS, com exceção do O6. As concentrações de anticorpos anti-LPS O6 foram intermediárias e, portanto maiores nas mães do grupo termo, que os níveis de IgM anti-LPS de *Klebsiella*, anti-LPS O26 e anti-LPS de *Pseudomonas*, mas não nos dois grupos de pré-termos, o que pode ser decorrente do menor número de amostras analisadas nestes dois últimos grupos.

Estas constatações sugerem que os níveis mais elevados são decorrentes de uma alta disseminação destes sorogrupos em décadas anteriores, onde o sorogrupo O111, em geral, representando o grupo das *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), foi considerado a principal causa de diarreia em infantes em muitos países em desenvolvimento e, no Brasil, o sorotipo mais freqüentemente isolado. Já as *E. coli* O26 foram isoladas mais raramente, correspondendo apenas a 5% dos isolados de EPEC (Nataro e Kaper, 1998; Gomes, et al., 1996).

Em outro estudo, a análise de amostras fecais de pacientes com diarreia em São Paulo, coletadas entre 1976 e 1999, revelou 29 linhagens de *E. coli* produtoras de toxinas Shiga (STEC) pertencentes, principalmente, aos sorotipos O111:H⁻ (44,8%), O111:H8 (24%), e em números menos proeminentes, ao sorotipo O26:H11 (13,8%), demonstrando que o O111 é o sorogrupo predominante também entre os isolados de STEC (Vaz, et al., 2004).

Já as linhagens de *Klebsiella* e *Pseudomonas* são isoladas com freqüência do trato intestinal de neonatos nos primeiros dias de vida, e vão sendo substituídas por outras espécies, durante a colonização pela microbiota, tornando-se incomuns no trato intestinal de adultos (Bezirtzoglou, 1997). Deste modo, os níveis de anticorpos IgM mais baixos observados em nosso trabalho, específicos para estes patógenos, provavelmente refletem um contato reduzido das mães com estas linhagens.

Outro aspecto a ser discutido é a importância de anticorpos dirigidos a outros fatores de virulência presentes em cada espécie de bactéria. Embora em nosso trabalho, o enfoque seja a pesquisa de anticorpos anti-LPS que, em última instância, é responsável pela sepse neonatal, cada linhagem bacteriana antes de translocar-se e invadir a circulação sistêmica, necessita aderir e colonizar o trato intestinal. Portanto, anticorpos dirigidos a fimbrias e adesinas envolvidas na colonização

também têm uma participação importante na proteção conferida ao neonato.

Palmeira e colaboradores (2005) demonstraram que anticorpos IgA de colostro humano, derivados de mães de nossa região, reconheciam uma banda de 94 kDa compatível com a adesina intimina de STEC e EPEC, a principal responsável pela adesão bacteriana ao enterócito, e todas as amostras de colostro foram capazes de inibir a adesão destas bactérias em células epiteliais *in vitro*. Por outro lado, os anticorpos dirigidos ao LPS O111 destas linhagens não apresentaram capacidade inibitória. Já Paton e colaboradores (1998) demonstraram que anticorpos anti-LPS O111 e anti-LPS O157 inibiram 95% da adesão de EHEC homóloga as células Henle 407 e sugerem que anticorpos anti-LPS podem interferir na colonização do intestino por EHEC.

As correlações altamente significativas verificadas entre as concentrações de anticorpos IgM reativos com todos os LPS entre si e os valores de correlação mais baixos observados entre os níveis de IgG anti-LPS indicam reatividade cruzada dos anticorpos dirigidos à estes antígenos.

O LPS contém uma porção polissacarídica altamente variável e antigênica (antígeno O), o *core* e o lipídeo A, responsável pelos efeitos tóxicos desta molécula. A estrutura do lipídio A é altamente conservada entre as bactérias Gram-negativas, especialmente entre as enterobactérias, o que proporciona, de um modo geral, atividades biológicas comparáveis do LPS, independente das propriedades patogênicas de bactérias correlacionadas filogeneticamente (Luderitz, et al., 1973; Freudenberg, et al., 2001). O *core* também compartilha epítomos entre as diversas bactérias Gram-negativas, o que poderia explicar a reatividade cruzada entre os anticorpos IgM dirigidos às espécies de *E. coli*, como também à outras espécies de bactérias Gram-negativas analisadas no presente trabalho (Currie, et al., 2001; Zapata-Quintanilla, et al., 2006)

As estratégias de vacinação contra *Klebsiella pneumoniae* baseiam-se no polissacarídeo capsular, embora existam alto número e prevalência de sorotipos capsulares. No entanto, o estudo de Clements e colaboradores (2008) demonstra que a imunização com LPS purificado de *K. pneumoniae* dos sorotipos K2:O1 e K1:O2 pode proteger camundongos desafiados com esta linhagens, pela ligação de anticorpos antígeno-O específicos às cápsulas bacterianas e assim, reduz a carga bacteriana *in vivo*. Além disso, estes autores verificaram que a infecção letal por *Klebsiella* em camundongos pode ser prevenida pela vacinação com LPS de sorotipos homólogos e heterólogos.

Trautmann e colaboradores (2004) sugerem que 82% de todos os isolados clínicos de *Klebsiella* pertencem aos sorogrupos O1, O2ab, O3 e O5 (Rukavina, et al., 2005), que compartilham um epítipo comum localizado no *core* da molécula do LPS (Trautmann, et al., 1994).

Estudos realizados há mais de 40 anos com vacinas para *Pseudomonas aeruginosa* estabeleceram que os antígenos O deste patógeno consistiram nos principais alvos para despertar uma imunidade altamente efetiva. Diante disso, Cryz e colaboradores (1988), desenvolveram uma vacina conjugada octavalente com o antígeno O do LPS de 8 sorotipos diferentes de *Pseudomonas* conjugados à exotoxina A (sorotipos 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11 e 16), que mostrou eficácia em estudos retrospectivos realizados em pacientes com fibrose cística (Cryz, et al., 1994, 1997; Lang, et al., 2004; Langford and Hiller, 1984; Schaadet, al., 1990).

Já as comparações realizadas entre as concentrações de anticorpos IgM e IgG específicos nas amostras de soro materno dos três grupos revelaram níveis significativamente mais altos de IgM específicos quando comparados aos mesmos níveis de IgG, o que já era esperado para um antígeno timo-independente do tipo 1, que desperta primariamente uma

resposta imunológica do tipo IgM, com baixa afinidade e switch de isotipos limitado a algumas subclasses de IgG (Lewis e Wilson, 2006).

Embora tenham sido verificados, na literatura, níveis de IgM anti-LPS significativamente mais elevados quando comparados aos níveis de IgG (Nagao, et al., 2001; Zapata-Quintanilla, et al., 2006; Palmeira, et al., 2007), Pontes e colaboradores (2005) demonstraram que a IgG purificada de um pool de soro humano normal contendo 1,1 µg/ml de anticorpos IgG anti-LPS O6 foi capaz de proteger camundongos desafiados com *E. coli* O6 viável. Por outro lado, a suspensão de IgM purificada do mesmo pool de soro humano normal não foi capaz de proteger os camundongos desafiados, independente da concentração de IgM anti-LPS O6 contida nesta suspensão (0,048 a 17,0 µg/ml de IgM anti-LPS O6). Portanto, embora a concentração de IgM anti-LPS O6 avaliada neste pool tenha sido maior do que a de IgG, níveis significativamente menores de IgG foram necessários para a proteção dos animais desafiados, demonstrando a eficiência dos anticorpos IgG séricos na proteção.

Uma infinidade de manuscritos utiliza como casuística RNs pré-termos para avaliar a possível deficiência na transmissão de imunoglobulinas e anticorpos específicos (Linder, et al., 1999; Doroudchi, et al., 2003). Porém, são poucos que reportam uma análise mais detalhada da causa da prematuridade nos bebês estudados, através da anamnese das gestantes ou parturientes (Okoko, et al., 2001; Okoko, et al., 2002a; Okoko, et al., 2002b) e outros, ainda, excluem da casuística, as mães com possíveis patologias de base.

Considerando, até o momento, as informações que os trabalhos com RNs pré-termos nos mostram, resolvemos explorar mais cuidadosamente o diferencial do nosso grupo amostral, que compreende parturientes com patologias de base, internadas no Hospital das Clínicas. Este estudo não teve o intuito de analisar especificamente cada patologia, já que é um

grupo heterogêneo, com várias patologias diferentes. No entanto, a análise da influência das patologias sobre o sistema imune da gestante pode ser um parâmetro importante, uma vez que estas são as mais prováveis de sofrerem trabalho de parto prematuro, além de intercorrências perinatais, fatores que podem ser preponderantes na compreensão da dinâmica do transporte transplacentário de anticorpos, e na saúde do neonato.

É estabelecido que a saúde e nutrição maternas sejam determinantes importantes do peso e saúde ao nascimento, e da frequência e severidade das complicações neonatais. A doença hipertensiva crônica ou específica da gestação consistiu na patologia mais freqüente apresentada pelas gestantes do presente trabalho, principalmente no grupo de RNs a termo.

Em estudo de coorte realizado no Brasil, a frequência de gestantes com doenças hipertensivas foi de 7,5% (Gaio, et al., 2001) Nestes casos, observa-se uma ocorrência aumentada de complicações maternas graves, como descolamento prematuro da placenta, hemorragia intracerebral, encefalopatia hipertensiva, insuficiência renal aguda, insuficiência cardíaca congestiva e arritmia ventricular maligna. O principal fator determinante de um bom prognóstico perinatal para estas gestantes é o início precoce e atenção diferenciada no pré-natal, levando a uma baixa incidência de complicações e prevenção de pré-eclâmpsia (Martins-Costa et al., 2005).

A pré-eclâmpsia é uma das complicações mais sérias da gestação e designa uma síndrome comum que se manifesta com hipertensão e proteinúria. É a segunda principal causa de mortalidade materna no mundo, constituindo 12 a 18% das mortes maternas relacionadas à gestação. A proteinúria, caracterizada pela excreção aumentada de proteínas, é resultante de alta taxa de filtração glomerular, e estudos revelam níveis significativamente reduzidos de IgG em gestantes com pré-

eclâmpsia, quando comparadas às saudáveis, provavelmente resultante da perda de proteínas na urina (Arinola, et al., 2006).

Outra complicação clínica freqüente da gestação é o diabetes gestacional, podendo atingir cerca de 1 a 3% das gestantes. Em estudo de Meneses e colaboradores (1999), a prematuridade foi 1,8 vezes mais freqüente no grupo de diabetes gestacional do que no grupo controle, constituído por gestantes saudáveis. Os recém-nascidos pré-termos de mães diabéticas foram todos produtos de gestações não-controladas, sugerindo que o controle metabólico inadequado predispõe, muitas vezes, à interrupção precoce da gestação.

Entretanto, o fator responsável pelo trabalho de parto prematuro, muitas vezes, não é identificado. Evidências demonstram uma relação estreita entre o nascimento prematuro e infecções no trato geniturinário. Estudos sugerem que estas infecções levam a um enfraquecimento das membranas corioamnióticas (evidenciado por menor tensão de rompimento, menor trabalho para sofrer ruptura e menor elasticidade *in vitro*) e à produção de prostaglandinas pelo âmnio (Gibbs, et al., 1992).

Em estudo realizado com mais de 9.500 partos, evidências confirmatórias demonstraram que a corioamnionite e infecções neonatais foram significativamente aumentadas em gestações de pré-termos, o que sugere que infecções subclínicas levam ao trabalho de parto e a infecção se torna clinicamente evidente após o parto (Seo, et al., 1992)– Outros autores não estabelecem essa relação e argumentam que a infecção ocorre com mais freqüência no pré-termo, por ele ser um hospedeiro mais imunocomprometido ou por ter uma monitoração mais invasiva no berçário (Davies e Gibbs, 2006).

O parto de bebês com baixo peso também tem sido associado a um número de condições patológicas da placenta, como corioamnionite, mudanças isquêmicas e corioangiose (Salafia et al., 1995; Beebe et al.,

1996). Estas mudanças podem promover danos nos receptores Fc γ que transportam a IgG através da placenta. Existem subtipos destes receptores que apresentam maior ou menor afinidade por certas subclasses de IgG. Pelo fato destes receptores apresentarem especificidades diferentes para as subclasses de IgG e se localizarem em diferentes regiões anatômicas da placenta, certas condições patológicas podem danificar mais um tipo de receptor do que outro, o que pode afetar o transporte de uma subclasse de IgG e de outra não.

Na literatura os relatos que associam transmissão placentária de anticorpos com patologias se restringem à infecção por malária, que causa danos patológicos diretamente no tecido da placenta por aderir ao epitélio viloso trofoblástico e infecção por HIV, que embora o dano histológico à placenta não esteja bem caracterizado, leva a hipergamaglobulinemia materna, acarretando uma diminuição da transferência de anticorpos reativos com alguns patógenos para o neonato (Moraes-Pinto et al., 1998).

Por outro lado, os fatores de risco para a ocorrência de infecções e sepse neonatal incluem prematuridade, ruptura prematura de membranas e febre materna durante o parto, causada por infecção intra-amniótica. O líquido amniótico é, normalmente, estéril até o início do trabalho de parto ou da ruptura de membrana, quando bactérias do trato genital inferior materno entram na cavidade amniótica. Está demonstrado que infecções intra-uterinas evidenciadas clinicamente se desenvolvem após a metade da gestação em 1 a 10% das gestantes, levando a uma morbidade materna aumentada, assim como morbidade e mortalidade perinatal (Davies e Gibbs, 2006).

Algumas amostras de soro de RNs pré-termos foram testadas, em nosso trabalho, com o objetivo de investigar uma possível infecção intra-uterina, revelada pela presença de anticorpos IgM totais e específicos no soro de cordão umbilical. Foram detectados níveis de IgM total nas amostras dos RNs 7, 10 e 34. A amostra 7 foi investigada porque a

parturiente, além de apresentar níveis abaixo da normalidade de IgG total (151 mg/dl), também apresentou infecção urinária e corioamnionite durante a gestação, e o seu RN desenvolveu uma onfalite (infecção do coto umbilical). Com relação à amostra 10, o RN apresentou conjuntivite pós-parto e a amostra 34, seu RN desenvolveu sepse tardia.

Foram encontrados níveis de IgM totais nos soros desses RNs (17,65; 20,25 e 18,5 mg/dl, respectivamente). No entanto, anticorpos IgM específicos somente foram identificados na amostra do RN nº 34, que apresentou 0,28 µg/ml de IgM anti-LPS O6. Não foram detectadas concentrações de IgM anti-LPS O111, O26, de *Klebsiella* e de *Pseudomonas* nessas amostras. Estes resultados indicam infecções congênitas adquiridas por esses bebês, que poderiam ser causadas por qualquer patógeno ou, no caso do RN nº 34, poderia ter sido causada por uma *E. coli* O6 ou outra bactéria Gram-negativa, cujo LPS compartilhe epítomos com o da *E. coli* O6.

Os relatos descritos acima sobre as patologias mais freqüentes identificadas em nosso grupo amostral não apresentaram referências à transmissão de anticorpos aos recém-nascidos, embora alguns tenham mencionado os níveis de imunoglobulinas maternos.

Uma informação importante sobre o efeito das patologias maternas sobre a transmissão de anticorpos foi revelada através da análise da amostra nº 35. Esta parturiente é portadora de várias patologias graves (Lupus eritematoso sistêmico, acidente vascular cerebral, comunicação interatrial, Coréia), seus níveis de IgG total estão dentro da normalidade, no entanto as taxas de transferência de anticorpos IgG totais e específicos para seu RN foram sistemática e drasticamente reduzidas.

De um modo geral, para analisar o efeito das patologias sobre a transmissão de anticorpos para o RN, subdividimos o nosso grupo amostral em mães com e sem patologias do grupo de RNs pré-termos e do grupo a termo.

A análise comparativa das mães com e sem patologias do grupo termo não revelou diferenças estatísticas significativas nos níveis de IgG maternos e neonatais e taxas de transferência, enquanto a análise do grupo pré-termo revelou níveis mais reduzidos de IgM total e específico para os LPS de *Klebsiella*, *E. coli* O111, O26 e *Pseudomonas* nas mães com patologias.

Estes resultados indicam, com nosso número amostral, não serem as patologias de base ou intercorrências perinatais, fatores preponderantes que promovam alterações significativas nos níveis de IgG totais e específicos maternos, assim como nos níveis transmitidos aos recém-nascidos.

Por outro lado, analisando-se as amostras maternas sem patologias, e realizando uma comparação entre os conjuntos de amostras de RNs pré-termos e a termo, os níveis maternos de anticorpos IgG totais e específicos não apresentaram diferenças significativas. Foram encontradas diferenças nas concentrações de IgG sérica total e anti-LPS O6 nas amostras de RNs pré-termos quando comparados com RNs a termo, e transferências significativamente mais baixas de anticorpos IgG reativos com todos os LPS para os RNs pré-termos.

Estes resultados já eram esperados, uma vez que a análise do grupo pré-termo já havia revelado taxas de transferência reduzidas em relação aos RNs a termo, ressaltando a prematuridade como fator limitante na transferência de anticorpos. Embora não tenham sido encontradas diferenças entre os valores absolutos de concentrações de IgG específicas nos RNs pré-termos, com exceção do IgG anti-LPS O6, este fato não descarta a baixa transmissão de anticorpos durante a gestação, pois esta independe da concentração de anticorpos IgG apresentados pela mãe e, conseqüentemente pelo seu RN. Em outras palavras, níveis de IgG maternos mais elevados podem proporcionar níveis mais altos em seus RNs, embora a taxa de transferência possa estar reduzida.

Ao analisar os níveis de IgM nas amostras das mães sem patologias, foram observados níveis significativamente mais elevados de IgM anti-LPS O111, O26 e anti-LPS de *Pseudomonas* nas mães de RNs pré-termos quando comparadas às mães de termo, indicando que as mães de pré-termos têm um maior contato com patógenos relacionados ou podem apresentar infecções subclínicas, não diagnosticadas durante a gestação, despertando a produção de anticorpos IgM específicos.

As amostras de soro de mães com patologias não revelaram diferenças significativas nos níveis de IgG totais e específicos entre os grupos termo e pré-termo. A análise de IgG total e específica nos soros de neonatos revelou menores níveis de IgG total e anti-LPS O26 e de *Pseudomonas* nos RNs pré-termos das mães com patologias. Entretanto, surpreendentemente, a taxa de transferência só se mostrou reduzida para IgG total nos RNs pré-termos, revelando taxas equivalentes de transferência de anticorpos específicos entre o grupo de pré-termos e a termo, o que sugere uma potencialização da transmissão de anticorpos específicos para RNs prematuros de mães com patologias de base.

Embora alguns resultados tenham se mostrado promissores em nossa análise, para investigarmos mais detalhadamente a influência das patologias mais freqüentes, identificadas no presente trabalho, sobre a aquisição de anticorpos anti-LPS pelo neonato, precisaríamos analisar isoladamente cada patologia, com um maior número de sujeitos e realizar uma análise mais apropriada.

Em resumo, no presente trabalho, foram encontradas concentrações e taxas de transferência de anticorpos IgG totais diminuídas nos grupos de RNs pré-termos quando comparados aos RNs a termo. Os RNs pré-termos não apresentaram níveis reduzidos de IgG específica para todos os LPS estudados, no entanto as taxas de transferência foram reduzidas quando comparadas às observadas em neonatos a termo. Foram observadas importantes correlações inversas entre níveis de IgG maternos e taxas de

transferência. Os níveis de IgM totais e específicos maternos apresentaram altos índices de correlação entre si. As patologias maternas promoveram uma redução nos níveis de anticorpos IgM maternos do grupo pré-termo e possivelmente, induziram uma potencialização na transmissão de anticorpos IgG específicos neste grupo, quando comparado ao grupo termo.

Embora neonatos pré-termos claramente não recebam níveis de anticorpos específicos adequados, decorrentes de uma transmissão reduzida em função da idade gestacional, a mortalidade e morbidade nos períodos perinatal e neonatal são principalmente causadas por condições que podem ser evitadas e tratadas. As altas taxas de infecções neonatais nos países em desenvolvimento e os tipos de infecções mais comuns identificadas (infecções sistêmicas com Gram-negativos, onfalites e gastroenterites) fortemente sugerem que a falta de higiene apropriada durante o parto, na fase pós-natal e na alimentação sejam os maiores contribuintes para o desenvolvimento de infecções graves nos neonatos vulneráveis (Bhutta e Yusuf, 1997; Fikree, et al., 2001).

Intervenções envolvendo práticas básicas de controle de infecção como higiene das mãos, isolamento, técnicas de assepsia, limpeza e esterilização de equipamentos podem prevenir e controlar as infecções neonatais nos países em desenvolvimento. Além disso, intervenções realizadas durante o pré-natal reduzem a incidência de partos prematuros, intervenções obstétricas durante o parto reduzem complicações neonatais, e por fim, as intervenções pós-parto incluem cuidados adequados com a pele e coto umbilical e a prática do aleitamento materno exclusivo, que além dos benefícios nutricionais, auxilia na proteção contra doenças (Stoll, 2001; Darmstadt, et al., 2003; Moss, et al., 2002)

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que:

- Os níveis de anticorpos IgG totais dos recém-nascidos são proporcionais ao seu grau de prematuridade, e podem ser evidenciados por concentrações de anticorpos IgG totais e taxas de transferência reduzidas em amostras de recém-nascidos pré-termos $\leq$ 33 semanas e $>$ 33 semanas quando comparados aos recém-nascidos a termo.
- Embora a condição de prematuridade tenha sido associada a concentrações reduzidas de anticorpos IgG reativos com alguns dos LPS testados, mas não com todos, as taxas de transferência de IgG foram significativamente inferiores para os LPS de *Klebsiella*, de *E. coli* O6 e O111, e de *Pseudomonas* no grupo de pré-termos $\leq$ 33 semanas e para os LPS de *E. coli* O6, O26 e *Pseudomonas* no grupo de RNs pré-termos $>$ 33 semanas, ambos comparados ao grupo termo.
- As mães de RNs pré-termos e a termo apresentaram concentrações equivalentes de anticorpos IgM totais e específicos para os LPS testados.
- A análise do efeito das patologias ou intercorrências perinatais apresentadas por algumas parturientes indicou uma redução nos níveis de anticorpos IgM reativos com alguns dos LPS testados em mães do grupo pré-termo e, sugere uma potencialização da transmissão de anticorpos IgG específicos neste grupo, quando comparado ao grupo termo, também de mães com patologias. A ausência de alterações nas concentrações de IgG totais e específicas

maternas, assim como nos níveis transmitidos aos RNs, comparando-se mães com e sem patologias, de ambos os grupos sugere que as patologias não sejam fatores preponderantes que interfiram na aquisição de anticorpos por recém-nascidos pré-termos e a termo.

Embora as taxas de transferência de anticorpos IgG reativos com os LPS de enterobactérias incidentes em infecções neonatais sejam significativamente reduzidas em RNs pré-termos, nem sempre as concentrações destes anticorpos são diferentes das observadas em neonatos a termo, o que indica que a maior suscetibilidade à infecções apresentada por neonatos pré-termos é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos à condição de prematuridade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIH Infecção em recém-nascidos. Disponível em: http://www.agih.com.br/artigos_det.php?id=3[2006 jul 4].

Arinola G, Arowojolu A, Bamgboye A, Akinwale A, Adeniyi A. Serum concentrations of immunoglobulins and acute phase proteins in Nigerian women with preeclampsia. *Reprod Biol*. 2006;6(3):265-274.

Arruda EAG. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31(5):503-4.

Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Wasman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr*. 1991;119(3):417-23.

Ballow M, Cates KL, Rowe JC, Goetz C, Desbonnet C. Development of the immune system in very low birth weight (less than 1500g) premature infants: concentrations of plasma immunoglobulins and patterns of infections. *Pediatr Res*. 1986;20:899-904.

Beebe LA, Cowan LD, Altshuler G. The epidemiology of placental features: associations with gestational age and neonatal outcome. *Obstet Gynecol*. 1996;87:771-8.

Benirschke K, Kaufmann P. Early development of the human placenta. *Pathology of the human placenta*. 3. ed. New York: Springer-Verlag; 1995.p.49-56.

Bezirtoglou E. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*. 1997;3:173-177.

Bhutta ZA, Yusuf K. Early-onset neonatal sepsis in Pakistan: case control study of risk factors in a birth cohort. *Am J Perinatol*. 1997;14:577-81.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform requirements of manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from:<http://www.icmje.org>[2004 may 06].

Blanco J, Alonso, MP, Gonzales E.A, Blanco M, Garabal JL. Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor (CNF) by P-fimbriate strain. J Med Microbiol. 1990;31:175-83.

Bona C, Bot A. Neonatal immuno-responsiveness. Immunologist. 1997;5:5-10.

Brair ME, Brabin BJ, Milligan P, Maxwell S, Hart CA. Reduced transfer of tetanus antibodies with placental malaria. Lancet. 1994;343:208-9.

Brambell FWR, Halliday H, Morris IG. Interference by human and bovine serum and serum protein fractions with the absorption of antibodies by suckling rats and mice. Proc R Soc Lond Ser B, Biol Sci. 1958;149:1-11.

Brambell FWR. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. Lancet. 1966;2:1087-93.

Bhutta ZA, Yusuf K. Early-onset neonatal sepsis in Pakistan: case control study of risk factors in a birth cohort. Am J Perinatol. 1997;14:577-81.

Capurro H, Konichezky S, Fonseca, D, Caldeiro-Badia RA. Simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. J Pediatr. 1978;93:120.

Carneiro-Sampaio MMS, Grumach AS. O desenvolvimento da resposta imune da criança. Alergia e imunopatologia em pediatria. São Paulo: Sarvier, 1992. p.15-17.

Carvalho BTC, Vieira HMS, Carbonare SB, Ribeiro MA, Grisardi N, Carneiro-Sampaio MMS. Niveles de inmunoglobulinas y lisozimas em sangre de cordón umbilical en recién nacidos de diversas edades gestacionales. Rev Latinoam Perinatol. 1988;8:98-105.

Catty D, Drew R, Seger R. Transmission of IgG subclasses to the human foetus. In: Hemmings WA, editor. Protein transmission through living membranes. London:Elsevier; 1979. p.37-43.

Ceccon MEJ, Diniz EMA, Vaz FAC, Ramos JLA. Immunity of the newborn infant. Pediatría. 1997;19(1):9-23.

Charles OAO, Susane EM, Grussner H-RT. Early pregnancy loss and neonatal deaths associated with *Klebsiella pneumonia* infection: a

mini review of possible occupation health risk. Arch Gynecol Obstet. 2005;273:258-60.

Clements A, Jenney AW, Farn JL, Loren, Brown LE, Deliyannis, G, Hartland EL, Pearse MJ, Maloney MB, Wesselingh SL, Wijburg OL, Strugnell RA. Targeting subcapsular antigens for prevention of *Klebsiella pneumoniae* infections. Vaccine. 2008;26:5649-5653.

Couto RC, Carvalho EAA, Pedrosa TMG, Pedroso ER, Neto MC, Biscione FM. A 10-years prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal intensive care units. Am J Infect Control. 2007;35(3):183-87.

Cryz JR, Wedgwood J, Lang AB, Ruedeberg A, Que JU, Furer E, Schaad UB. Immunization of noncolonized cystic fibrosis patients against *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis. 1994;169:1159-1162.

Cryz JR, Lang A, Rudeberg A, Wedgwood J, Que JU, Furer E, Schaad U. Immunization of cystic fibrosis patients with a *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. Behring Inst Mitt. 1997;345-349.

Currie CG, McCallum K, Poxton IR. Mucosal and systemic antibody responses to the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157 in health and disease. J Med Microbiol. 2001;50:345-54.

Dai D, Walker WATÍ. Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut/Nutrientes protetores e colonização bacteriana no intestino humano imaturo. Adv Pediatr. 1990;46:353-82.

Darmstadt GL, Lawn JE, Costello A. Advancing the state of the world's newborns. Bull World Health Organ. 2003;81:224-5.

Davies JK, Gibbs RS. Obstetric factors associated with infections in the fetus and newborn infant. In: Remington JS, Klein JO. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. p. 59-86

De Morais- Pinto MI, Almeida ACM, Kenj G, Filgueiras TE, Tobias W, Santos AMN, et al. Placental transfer and maternally acquired neonatal IgG immunity in HIV infection. J Infect Dis. 1996;173:1077-84.

De Morais-Pinto MI, Verhoef F, Chimsuku L, Milligan P, Wesumperuma L, Broadhead R, et al. HIV infection and placental malaria reduce placental antibody transfer. Arch Dis Child. 1998;79:F202-5.

De Morais-Pinto MI, Lazzetti AV, Farhat CK. Transporte Transplacentário de anticorpos: implicações na proteção do recém-nascido e em estratégias de imunização. Revista Paulista de Pediatria. 2001;19:87-92.

Doroudchi M, Dehaghani AS, Emad K, Ghaderi A. Placental transfer of rubella-specific IgG in fullterm and preterm newborns. International Journal of Gynecology and Obstetric. 2003;81:157-62.

Englund JA, Glezen WP, Turner C, Harvey J, Thompson C, Siber GR. Transplacental antibody transfer following maternal immunization with polysaccharide and conjugate Haemophilus influenzae type b vaccines. J infect Dis. 1995;171:99-105.

Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG. IgG subclassdistribution of antibodies to bacterial and viral antigens. Pediatric Infections Diseases. 1990;9:S16-S24.

Fikree FF, Marsh DR, Ali N, Bhutta ZA. State of the world's newborns: Pakistan. A report from saving newborn lives. Islamabad: Save the Children Federation; 2001.

Fichtenbaum CJ, Woeltfe KF, Powderly WG. Serious *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients infected with human immunodeficiency virus: a case control study. Clin Infect Dis. 1994; 19:417-422.

Freij BJ, McCracken GHJ. Acute Infections. In: Avery GB, Fletcher MA, Macdonald MG. editors. Neonatology Pathophysiology and Management of the Newborn. 5thed. Phyladelphia. JB. Lippincott Company. 1999.p-1082-1116.

Fomsgaard A. Antibodies to lipopolysaccharides some diagnostic and protective aspects. APMIS.1990;98(18):1-36.

Fujimura MD. Níveis séricos das subclasses da imunoglobulina G em crianças normais e nefróticas. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;1991.

Franzolin MR, Alves RCB, Keller R, Gomes TA, Beutin L, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Trabulsi LR. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(4):359-63.

Freudenberg MA, Merlina T, Gumenscheimera M, Kalisa C, Landmannb R, Galanos C. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection:

LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. *Microbes Infect.* 2001;3: 1213-22.

Gaio DS, Schmidt MI, Duncan BB, Nucci LB, Matos MC. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. *Hypertension Pregnancy.* 2001; 20(3): 269-82.

Gathings WE, Awton AR, Cooper MD. Immunofluorescent studies on the development of pre-B cells, B lymphocytes, and immunoglobulin isotype diversity in humans. *Eur J Immunol.* 1977;7:391-399.

Gelfand HM, Stream GJ, Pavlanis V, Sternberg J. Studies in placental permeability. Transmission of poliomyelitis antibodies, lipoproteins and cholesterol in single and twin newborn infants. *Am J Obstet Gynecol.* 1960;79:117-33.

Gendrel D, Richard-Lenoble D, Fribourg-Blanc A. Transfert des immunoglobulines et des anticorps antirougeoleux de la mère à l'enfant en Afrique et en Europe. *Presse Med.* 1988;17:1633-6.

Gendrel D, Richard-Lenoble D, Massamba MB, Picaud A, Moreno JL, Gendrel C et al. Transfert placentaire des anticorps antitétaniques et protection du nouveau-né. *Arch Fr Pediatr.* 1990;47:725-9.

Giardi-Dias AM. Fatores de virulência e padrão de resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas em infecções extra-intestinais. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo;1992.

Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166:1515-28.

Gomes TAT, Rassi V, MacDonald KL. Enteropathogens associate with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis.* 1991;164:331-7.

Gomes TAT, Griffin PM, Ivey C, Trabulsi LR, Ramos SRTS. EPEC infections in São Paulo. *Rev Microbiol.* 1996;27:25-33.

Gotoff SP. Sepsis in the newborn. In: Krugman S, SL, Katz AA, Gershon, Wilfert CM editors. *Infectious diseases of children.* 9th ed. Mosby-Year Book: St. Louis; 1992.p.402-18.

Guth BEC, LopesR, Vaz TMI, Irino K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome in Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:535-536.

Gransden WR, Eykyn SJ, Phillips I, Rowe B. Bacteremia due to *Escherichia coli*: a study of 861 episodes. *Rev Infect Dis*. 1990;12:1008-18.

Hall MA, Cole C B, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early. *Arch Dis Childhood*. 1990;65:185-188.

Hyder AA, Wali SA, McGuckin J. The burden of disease from neonatal mortality: a review of South asia and Sub-Saharan Africa. *BJG*. 2003;110:894-901.

Ishizaka T, Ishizaka K, Salmon S, Fudenberg H. Biologic activities of aggregated – globulin VIII. Aggregated immunoglobulins of different classes. *J Immunol*. 1976;99: 82-91.

Kamat M, Pyati S, Pildes RS. Measles antibody titres in eaely infancy. *Archives of Pediatric and Adolescent Medicine*. 1994;148:694-698.

Kameda T, Koyama M, Matsuzaki N, Taniguchi T, Saji F, Tanizawa O. localization of three subtypes of Fc recptor in human placenta by immunohistochemical analysis. *Placenta*. 1991;12:15-26.

Kaushik SL, Parmar VR, Grower PS, Kaushik R. Neonatal sepsis in hospital born babies. *J Commun Dis*. 1998; 30:147-52.

Kohler PF, Farr RS. Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin: evidence for an active placental IgG transport. *Nature*. 1966;210:1070-1071.

Krebs VLJ e Taricco LD. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62(3-A):630-34.

Landor M. Maternal-fetal transfer of immunoglobulins. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1995;74:279-83.

Lang AB, Rudeberg A, Schoni MH, Que JU, Furer E, Schaad UB. Vaccination of cystic fribrosis patients against *Pseudomonas aeruginosa* reduces the proportion of patients infected and delays time to infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:504-510.

Langford DT, Hiller J. Prospective, controlled study of a polyvalent *Pseudomonas* vaccine in cystic fibrosis- three year results. *Arch Dis Child*. 1984;59:1131-1134.

Levy O, Martin S, Eichenwald E, Ganz T, Valore E, Carroll SF, et al. Impaired innate immunity in the newborn: neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. *Pediatrics*. 1999;104:1327-33.

Leigh L, Stoll BJ, Rahman M, McGowan J. *Pseudomonas aeruginosa* infection in very low birth weight infants: a case-control study. *Pediatr Infect Dis J*. 1995; 14:367-371.

Lewis DB, Wilson CB. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility to infection. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2006. p. 87-210.

Linder N, Sirota L, Aboudy Y, German B, Lifshits T, Barnea BS, Lieberman B, Mendelson E, Barzilai A. Placental transfer of Maternal Rubella antibodies to Full-term and preterm infants. *Infection*. 1999;27:203-7.

Longsworth LG, Curtis RM, Pembroke JR. The electrophoretic analysis of maternal and fetal plasmas and sera. *J Clin Invest*. 1945;24:46-53.

Luderitz O, Galanos C, Lehmann V, Nurminen M, Rietschel ET, Rosenfelder G, Simon M, Westphal O, Lipid A: chemical structure and biological activity. *J Infect Dis*. 1973;128(suppl.)17-29.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Microbiologia de Brock*. 10^a Ed. São Paulo: Prentice- Hall; 2004. p.52-94.

Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaides KH, Schneider H. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1996; 1:667-9.

Mäntyjärvi R, Hirvonen T, Toivanen P. Maternal antibodies in human neonatal sera. *Immunology*. 1970;18:449-51.

Martins SH, Ramos JGL, Vettori DVV, Valério EG. Hipertensão crônica e complicações na gravidez. *Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*. 2005;5:[Mai/Jun/Jul/Ago].

Maródi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clinical immunol*. 2006;118:137-44.

Marshall-Clarke S, Reen D, Tasker L, Hassan J. Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol.Today*. 2000;21:35-41.

McNabb T, Koh TY, Dorrington, KJ, Painter RH. Structure and function of immunoglobulin domains. Binding of immunoglobulin G and fragments to placental membrane preparations. J Immunol. 1976;117:882-888.

Meno Y, Amako K. Morphological evidence for penetration of anti-O antibody through the capsule of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 1990;58(5):1421-1428.

Meneses JA, Diniz EMA, Simões A, Vaz FAC. Mortalidade neonatal em recém-nascidos de mães com diabetes gestacional. Pediatría. 1999;21(1):30-6.

Michaux JL, Heremans JF, Hitzig WH. Immunoglobulin levels in cord-blood serum of negroes and caucasians. Trop Georg Med. 1966;18:10-4.

Moor DL. Nosocomial infections in newborn nurseries and neonatal intensive care unit. In: Mayhill CG editor. Hospital epidemiology and infection Control: Maple Press Baltimore; 1996.p.175-195.

Moss W, Darmstadt GL, Marsh DR, Black RE, Santosham M. Research priorities for the reduction of perinatal and neonatal morbidity and mortality in developing country communities. J Perinatol. 2002;22:484-95.

Mussi-Pinhata MM, Rego ACM. Immunological peculiarities of extremely preterm infants: a challenge for the prevention of nosocomial sepsis. J Pediatr. 2005;81(S1):S59-S68.

Nagao, AT, Martinez, CC, Vieira, VS, Takano, OA, Costa-Carvalho, BT, Carneiro-Sampaio, MMS. Placental transfer of IgG and IgG subclass antibodies anti-purified *Escherichia coli* LPS O16, O6 and O111. Scand J Immunol. 1998;47:609-14.

Nagao, AT, Arslanian C, Solé D, Carneiro-Sampaio MMS. Placental transfer of IgG antibodies against *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide in Brazilian term and preterm newborns. J Trop Pediatr. 1999;45:171-73.

Nagao, AT, Friedlander-Del Nero D, Arslanian C, Carneiro-Sampaio, MMS. Elevated levels and different repertoire profile of colostrum anti-LPS antibodies may have a significant role in compensating newborn immunity. J Immunol. 2001;53:602-609.

Nagata E, Brito AS, Matsuo T. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit: incidence and risk factors. *Am J Infect control*. 2002;30:26-31.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol*. 1998;1:142-201.

Okoko JB, Wesumperuma HL, Hart CA. The influence of prematurity and low birthweight on transplacental antibody transfer in a rural West African population. *Trop Med International Health*. 2001;6(7):529-34.

Okoko JB, Wesumperuma HL, Fern J, Yamuah LK & Hart CA. The transplacental transfer of IgG subclasses: influence of prematurity and low birthweight in the Gambian population. *Ann Trop Paediatr*. 2002a; 22:325-32.

Okoko BJ, Ota MO, Yamuah LK, Idiong D, Mkpanam SN, Avieka A, Banya WA, Osinusi K. Influence of placental malaria infection on foetal outcome in the Gambia: twenty years after Ian Mcgregor. *J Health Popul Nutr*. 2002b;Mar;20(1):1-3.

Orlandi PP, Magalhães GF, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA, Pereira da Silva LH. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, Western Amazon region, Brazil). *Brazilian J Med Biol Res*. 2006;39:507-17.

Palmeira P, Carbonare SB, Amaral JA, De Franco MT, Carneiro-Sampaio MMS. Colostrum from healthy Brazilian women inhibits adhesion and contains IgA antibodies reactive with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Eur J Pediatr*. 2005;164:37-43.

Palmeira P, Ito YL, Arslanian C, Carneiro-Sampaio MMS. Passive immunity acquisition of maternal anti-enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:h7 IgG antibodies. *Eur J Pediatr*. 2007;166:413-19.

Paton AW, Voss E, Manning PA, Paton JC. Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to human intestinal epithelial (Henle 407) cells. *Microb Pathog*. 1998;24:57-63.

Poduschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;p:589-603.

Pontes Gn, Massironi SG, Arslanian C, Palmeira P, Carneiro-Sampaio, Nagao AT. Human IgG but not IgM antibodies can protect mice from the challenge with live O6 Escherichia coli. Scand J Immunol. 2005; 62(4):353-60.

Proctor RA, Delinger LC, Bertics PJ. Lipopolysaccharide bacterial virulence. In: Roth JA, ed. Virulence Mechanisms of bacterial pathogens. 2nd edn. Washington: American Society of Microbiology; 1995. p.173-94.

Raetz CR. Bacterial endotoxins: Extraordinary lipids that activate eukaryotic signal transduction. J Bacteriol. 1993;5745-53.

Rajab A de LJ. Survey of infection in babies at the Khoula Hospital, Oman. Ann Trop Paediatr. 1990;10:39-43.

Richard-Lenoble D, Kombila M, Niel G, Fribourg-Blanc A, Boumerfeg M, Gendrel D. Passage transplacentaire des anticorps toxoplasmiques. Difference entre la mere africaine et européenne. Bull Soc Pathol Exot. 1988;81:365-8.

Rietschel ET, Schletter J, Weidemann B, El-Samalouti V, Mattern T, Zahringer U, Seydel U, Brade H, Flad HD, Kusumoto S, Gupta D, Dziarski R, Ulmer AJ. Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-

dependent bacterial inducers of inflammation, Microb Drug Resist. 1998;4:37-44.

Rijkers GT, Sanders EAM, Breukels MA, Zegers BJM. Infant B cell response to polysaccharide determinants. 1998;16:1396-1400.

Roopenian CD, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat Rev Immunol. 2007;7:715-25.

Rukavina T, Vasiljev V, Ticac B. Proinflammatory Cytokines in Antilipopolysaccharide Immunity Against *Klebsiella* Infections. Mediators Inflamm. 2005;2:88-95.

Sahly H, Podschun R. Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. Clin Diagn Lab Immunol. 1997;4:393-399.

Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. Rev Reprod. 1999;4:81-89.

Salafia CM, Minior VK, Pezzullo JC, Popek EJ, Rosenkratz TS, Vintzileos AM. Intrauterine growth restriction in infants of less than thirty-two weeks' gestation: associated placental pathologic features. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173:1049-57.

Salimonu LS, Ladipo OA, Adeniran SO, Osukoya BO. Serum immunoglobulin levels in normal, premature and postmature newborns and their mothers. *Int J Gynecol Obstet*. 1978;16:119-23.

Schaad UB, Lang AB, Wedgwood J, Ruedberg A, Furer E, Que Ju, Cryz Jr SJ. Immunization of non-colonized cystic fibrosis patients with a *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. *Pediatr Pulmonol*. 1990;5:91-92.

Schwartz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res*. 2003;54(3):393-99.

Sennhauser FH, Balloch A, Macdonald RA, Shelton MJ, Robertson DM. Materno fetal transfer of IgG anti-*Escherichia coli* antibodies with enhanced avidity and opsonic activity in very premature neonates. *Pediatr Res*. 1990;27:365-71.

Seo K, McGregor JA, French JA. Preterm birth is associated with increased risk of maternal and neonatal infection. *Obstet Gynecol*. 1992;79:75-80.

Simister NE, Story CM, Chen H-L, Hunt JS. An IgG transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol*. 1996;26:1527-31.

Stoll BJ. Children can't wait: Improving the future for the world's poorest infants. *J Pediatr*. 2001;139:729-33.

Toivanen P, Mantjarvi R, Hirvonen T. Maternal antibodies in human fetal sera at different stages of gestation. *Immunology*. 1968;15:395-403.

Tomás JM, Camprubi S, Williams P. Surface exposure of the O-antigen in *Klebsiella pneumoniae* O1:K1 serotype strains. *Microb Pathog*. 1988;5:141-147.

Trautmann M, Held TK, Cross AS. O antigen seroepidemiology of *Klebsiella* clinical isolates and implications for immunoprophylaxis of *Klebsiella* infections. *Vaccine*. 2004;22(7):818-21.

Trautmann M, Vogt K, Hammack C, Cross AS. A murine monoclonal antibody defines a unique epitope shared by *Klebsiella* lipopolysaccharides. *Infect Immun*. 1994;62(4):1282-1288.

Vaz TM, Irino K, Kato MA, Dias AM, Gomes TA, Medeiros MI, Rocha MM, Guth BE. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):903-5.

Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure. *Methods Carbohydr Chem*. 1965;5:83-91.

Wesumperuma HL, Perera AJ, Pharoah POD, Hart CA. The influence of prematurity and low birthweight on transplacental antibody in Sri Lanka. *Annals of Tropical Medical Parasitology*. 1999;93:169-177.

Westerbeek, EAM, Berge AVDB, Lafeber HN, Knol J, Fetter PF, Elburg RMV. The intestinal bacterial colonization in preterm infants: A review of the literature. *Clin Nutr*. 2006;25:361-368.

Williams P, Lambert PA, Brown MR. Penetration of immunoglobulins through the *Klebsiella* capsule and their effect on cell-surface hydrophobicity. *J Med Microbiol*. 1988;26(1):29-35.

World Health Organization. Neonatal and perinatal mortality: country, regional and global estimates. Available from: http://www.who.int/making_pregnancy_safer/publications/neonatal.pdf. [2008 Jan 14].

Zaidi, JM, Ponce dL-R, Vazquez-Narvaez G, Chable- Mendoza C. Prospective study of nasocomial infections at a pediatrics unit. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1991;48:538-43.

Zaki, M, Daound AS, Al Saleh Q, Al Rassol MM. Bacterial meningitis in the newborn: a Kuwait experience. *J Trop Pediatr*. 1990;36:63-65.

Zapata-Quintanilla LB, Palmeira P, Franco MT, Amaral JA, Carbonare CB, Carbonare, SB. Systemic Antibody response to diarrheagenic *Escherichia coli* and LPS O111, O157 and O55 in healthy Brazilian adults. *Scand J Immunol*. 64:661-667, 2006.

ANEXO 1

Descrição do peso e idade gestacional, resultados de IgG totais em amostras de soro das mães e amostras de soro de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos pré-termos e patologias e/ou intercorrências

Am	Peso (g)	Ig (sem)	IgG M PT (mg/dl)	IgG RN PT (mg/dl)	Transf (%)	Patologias e/ou Intercorrências (Mãe)	Patologias e/ou Intercorrências (RN)
1	2990 (AIG)	33 3/7	809	861	106,4	Isoimunização Rh; bolsa rota no ato do parto	*
3	3200 (GIG)	36 1/7	843	792	94,0	Isoimunização Rh;	Transfusão intrauterina
6	2460 (AIG)	35	988	832	84,2	Cardiopatia; doença miocárdica	*
7	1980 (AIG)	33 3/7	151	565	374,2	Corioamnionite; infecção urinária por bacilo gram-negativo; placenta prévia com sangramento	Onfalite
10	1860 (AIG)	35	821	822	100,1	Placenta prévia;	Taquipnéia transitória; conjuntivite
14	600 (PIG)	25 3/7	747	304	40,70	Doença hipertensiva específica da gestação	*
24	1870 (AIG)	32	1050	454	43,2	Corioamnionite aguda	*
33	2240 (AIG)	36	1026	806	78,6	Deslocamento prematuro da placenta	*
34	1120 (AIG)	29 2/7	424	475	112,0	Doença hipertensiva específica da gestação; eminência eclâmpsia,	Indicação de infecção por gram-negativo; hemograma infeccioso; sepse clínica; sepse neonatal tardia
35	2400 (AIG)	35 2/7	1068	134	12,5	Lupus eritematoso sistêmico; acidente vascular cerebral; comunicação interatrial; Coreia	*
40	1940 (AIG)	33 6/7	401	316	78,8	Lupus eritematoso sistêmico	*
41	3230 (GIG)	36 5/7	494	354	71,7	Diabetes gestacional	*
42	2000 (AIG)	35 1/7	1083	541	50,0	Hipertensão arterial crônica;	sofrimento fetal com taquicardia
48	2030 (AIG)	32 4/7	1212	1010	83,3	Corioamnionite,	Onfalite aguda; sepse precoce
50	870 (AIG)	30 4/7	537	756	140,8	Doença hipertensiva específica da gestação	*

Am: Amostras; IG: Idade gestacional em semanas; AIG: Amostrado para Idade gestacional; GIG: Gestante para Idade gestacional; M PT: Recém-nascido pré-termo; RN PT: Recém-nascido pré-termo; Transf: Taxa de transferência; * Sem patologia e/ou intercorrências

ANEXO 2

Descrição do peso e idade gestacional, resultados de IgG totais em amostras de soro das mães e amostras de soro de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos a termo e patologias e/ou intercorrências

Am	Peso (g)	IG (sem)	IgG M T (mg/dl)	IgG RN T (mg/dl)	Transf (%)	Patologias e/ou Intercorrências (Mãe)	Patologias e/ou Intercorrências (RN)
2	3300 (AIG)	39 1/7	961	990	103,0	Doença hipertensiva específica da gestação; infecção do trato urinário	*
4	2180 (AIG)	36 3/7	1117	1109	99,3		Crescimento intrauterino restrito
11	2840 (AIG)	38 5/7	905	1187	131,2	Arterite de Takayasu	*
13	3740 (GIG)	39 6/7	1154	1248	108,1	Plaquetopenia; doença hipertensiva específica da gestação	*
15	3360 (AIG)	40 5/7	996	1428	143,4	Doença hipertensiva específica da gestação; oligoamnio	*
17	3130 (AIG)	38 3/7	648	1001	154,5	Tromboembolismo pulmonar	*
19	2370 (AIG)	37 4/7	1005	1296	129,0	Nefrectomia por pielonefrite crônica	*
20	4900 (GIG)	39 3/7	804	881	109,6	Isoimunização Rh	*
25	2460 (PIG)	39	810	948	117,0	Obesidade; Oligoamnio	Crescimento intrauterino restrito
26	3060 (AIG)	38 2/7	973	891	91,6	Hipertensão arterial crônica	*
27	3780 (AIG)	41 6/7	1275	1338	104,9	Plaquetopenia	*
28	2790 (AIG)	40 6/7	986	1020	103,4	Hipotireoidismo	*
29	3660 (GIG)	38 4/7	1035	901	87,1	Doença hipertensiva específica da gestação; pré-eclâmpsia	*
30	3650 (GIG)	37 4/7	397	787	198,2	Hipertensão arterial crônica	*
31	2990 (AIG)	38 5/7	891	1124	126,2	Hipertensão arterial crônica; diabetes melitus tipo 2; obesidade	*
36	2740 (AIG)	38 3/7	711	801	112,7	Síndrome de Gilbert (disfunção hepática com icterícia); traço falciforme	Crescimento intrauterino restrito

Am: Amostras; IG: Idade gestacional em semanas; AIG: Adequado para idade gestacional; GIG: Grande para idade gestacional; PIG: Pequeno para idade gestacional; M T: Mãe de recém-nascido termo; RN T: Recém-nascido-termo; Transf: Taxa de transferência; * Sem patologia e/ou intercorrências

ANEXO 3
Níveis de IgG e IgM totais e específicos e taxas de transferência de IgG nas amostras de soro das mães e de seus respectivos recém-nascidos pré-termos ≤ 33 semanas

			IgG T			LPS <i>Klebsiella</i> (µg/ml)			LPS O6 (µg/ml)			LPS O111 (µg/ml)			LPS O26 (µg/ml)			LPS <i>Pseudomonas</i> (µg/ml)								
Am	IG	Peso (g)	M RN	Trans (%)	IgM T M	IgG M RN	IgG M RN	IgM Trans (%)	IgG M RN	IgG M RN	IgM Trans (%)	IgG M RN	IgG M RN	IgM Trans (%)	IgG M RN	IgG M RN	IgM Trans (%)	IgG M RN	IgG M RN	IgM Trans (%)						
8	33	2020	544	484	89,0	139	0,5	0,3	3,2	54,0	0,2	0,1	7,9	32,5	1,2	0,9	11,3	73,9	0,5	0,4	3,3	86,0	0,2	0,1	4,8	54,2
14	25 3/7	600	747	304	40,7	114	0,3	0,2	5,7	62,5	0,3	0,1	9,7	35,7	1,2	0,4	23,0	28,7	1,0	0,4	2,3	40,6	0,1	0,1	4,7	83,3
24	32	1870	454	1052	231,7	64	1,0	0,9	3,2	87,6	0,9	0,4	10,8	40,9	1,8	0,7	15,8	35,9	5,5	0,9	2,5	17,0	0,4	0,2	4,3	46,5
34	29 2/7	1120	424	475	112,0	84	3,9	2,8	1,8	72,5	0,4	0,4	3,0	100,0	2,4	1,9	7,2	82,1	5,8	4,0	1,0	69,0	0,4	0,5	2,5	118,4
48	32 4/7	2030	1212	1010	83,3	203	1,3	0,6	4,6	45,1	0,3	0,3	18,3	108,0	4,0	2,2	18,2	55,8	4,1	2,4	4,3	58,5	0,2	0,3	5,8	140,0
50	30 4/7	870	537	756	140,8	160	0,8	0,8	3,0	105,2	0,2	0,3	4,2	141,7	1,4	1,5	7,6	104,1	0,7	0,7	1,5	106,1	0,2	0,4	3,5	180,0
54	31 4/7	1335	1179	620	52,6	212	2,1	1,5	9,3	70,9	3,4	1,6	8,7	46,9	8,3	2,9	24,6	35,2	4,4	4,5	11,3	102,3	0,8	0,8	8,0	91,6
55	32 2/7	1880	674	534	79,2	598	0,7	0,5	10,9	75,8	0,6	0,4	31,6	77,2	1,5	0,7	72,7	47,0	5,2	4,8	8,4	92,3	0,2	0,2	13,2	90,0
56	26 6/7	740	716	207	28,9	129	1,6	0,9	3,4	60,9	0,5	0,4	13,5	70,4	3,3	0,6	20,0	18,2	1,4	0,8	4,0	59,3	0,6	0,5	4,6	89,3
60	28 1/7	640	669	336	50,2	207	1,0	0,6	14,3	67,0	1,6	0,5	12,4	33,3	2,5	0,9	105,1	36,0	0,9	1,1	12,4	128,7	0,4	0,7	20,9	175,0
62	30	1190	450	859	190,9	233	0,2	0,2	4,6	80,0	0,3	0,1	13,8	37,0	0,9	0,3	34,6	28,3	0,5	0,1	6,6	20,0	0,1	0,1	7,2	100,0

Am: Amostras; IG: Idade gestacional em semanas; ALG: Adequado para idade gestacional; GIG: Grande para idade gestacional; PG: Pequeno para idade gestacional; M RN: Mãe de recém-nascido pré-termo; RN PT: Recém-nascido pré-termo; Transf: Taxa de transferência; LPS: lipopolissacarídeo

ANEXO 4

Níveis de IgG e IgM totais e específicos e taxas de transferência de IgG nas amostras de soro das mães e de seus respectivos recém-nascidos pré-
termos

Am	IG	Peso (g)	IgG T		IgM T M	LPS <i>Klebsiella</i> (µg/ml)			LPS O6 (µg/ml)			LPS O11 (µg/ml)			LPS O26 (µg/ml)			LPS <i>Pseudomonas</i> (µg/ml)								
			M	RN		Trans (%)	IgG M	IgG RN	IgM M	Trans (%)	IgG M	IgG RN	IgM M	Trans (%)	IgG M	IgG RN	IgM M	Trans s (%)	IgG M	IgG RN	IgM M	Trans (%)				
1	36	2990	809	861	106,4	119	8	4,53	5,3	56,6	0,2	0,1	14,5	73,3	3,4	2,6	19,9	76,2	5	2,1	3,5	41	0,5	0,4	4,8	74,5
3	36 1/7	3200	792	843	111	106,4	0,2	0,3	4	143,5	0,5	0,5	13,7	110,2	1	1	12,9	105,3	0,6	0,6	2,4	85,9	0,2	0,2	4,6	100
6	35	2460	988	832	191	84,2	0,5	0,2	2,4	42,6	0,3	0,2	5,2	84	0,8	0,3	20,5	36,6	0,7	0,4	4,6	63,2	0,7	0,2	2,9	29
7	33 3/7	1980	151	565	71	374,2	2,5	2,6	8,3	104	0,2	0,3	23,5	213,3	0,4	0,8	14,8	192,9	0,1	0,1	3,3	162,5	0,3	0,5	3,6	163,6
10	35	1860	821	822	160	100,1	1	0,6	5,1	61,1	0,4	0,3	5,3	82,9	3,5	2,3	22	65,7	0,9	0,8	1,9	95,5	0,3	0,3	0,4	86,7
12	33 6/7	2050	751	340	169	45,3	0,6	0,5	12,7	79,4	0,2	0,1	22	54,6	2,7	4,1	45	151,3	0,2	0,1	4,2	81,3	0,2	0,2	7,8	95,2
21.1G	33 2/7	1570	670	440	65,7	240	1,6	1	10,1	60	0,3	0,1	17,7	56	2,1	1	33,1	47,1	1,4	0,7	3,8	49,3	0,3	0,2	13,2	57,7
21.2G	33 2/7	1570	670	456	68,1	240	1,6	0,6	10,1	36,3	0,3	0,2	17,7	80	2,1	1	33,1	53,9	1,4	0,5	3,8	37,7	0,3	0,2	13,2	80,8
33	36	2240	1026	806	78,6	78	1,1	0,7	0,7	59,5	0,7	0,5	3	70,6	1,2	0,5	5,3	39,1	0,1	0,1	0,7	57,1	0,4	0,2	1,3	41,7
35	35	2400	1068	134	12,6	131	0,5	0,4	0,1	76,9	0,4	0,1	0,5	18,6	2,2	0,1	0,1	4,7	0,5	0,1	0,2	20,9	0,2	0,1	0,9	25
40	33 6/7	1940	401	316	78,8	60	1,1	0,8	0,8	67,9	0,2	0,2	1,6	71,43	1,3	1,4	3,7	103,8	0,5	0,3	0,8	64,6	0,2	0,2	1,6	85,7
41	33 5/7	3230	494	354	71,7	77	0,2	0,2	2,4	75	0,4	0,3	5	78,4	1	1	4,7	95,1	0,9	0,5	1,9	53,3	0,3	0,2	2,2	80
42	35 1/7	2000	1083	541	50	250	0,8	0,8	2	98,8	1,43	1,69	39,4	118,2	2,2	2	32,4	95	2,2	2,2	6	102,	0,2	0,8	9	475
46	35 1/7	1990	732	998	136,3	199	0,2	0,3	3,8	135	0,1	0,1	8,9	75	1	0,8	12,3	84,2	0,6	0,4	4,3	72,1	0,2	0,2	5,5	111,1
47	34 5/7	1890	834	911	109,2	141	0,5	0,5	2,8	106,3	0,4	0,4	6,39	97,2	1,7	1,3	29,5	77,6	2,1	1,5	2,4	71,9	0,9	0,5	7,1	51,1
49	36 5/7	2760	1166	921	79	140	0,5	0,6	4,9	121,6	0,2	0,2	6,6	69,6	1,7	1,1	31,8	64,2	1,7	0,4	2,6	21,2	0,4	0,3	7,4	58,1
52	36 2/7	2390	1182	1230	104,1	175	1,4	1,7	15,3	122,2	1,4	0,5	23,5	35,7	2,5	4,2	44,4	164	2,4	3,1	4,9	129,	1,3	1,2	10,5	92,3
53	36 1/7	2330	576	675	117,2	189	0,9	0,2	5,5	16,5	0,3	0,4	10,1	114,7	0,6	0,6	31,7	103,6	1,6	0,5	4,9	28,8	0,6	0,1	10,4	18,2
61.1G	34 5/7	2130	353	515	145,9	149	0,9	0,8	4,9	94,2	0,1	0,9	8,4	90	2,3	2	20,6	89,4	2,9	1	2	35,7	0,4	0,4	3,7	100
61.2G	34 5/7	2040	353	741	209,9	149	0,9	0,8	4,9	94,2	0,1	0,9	8,4	90	2,3	2,4	20,6	106,7	2,9	0,4	2	14	0,4	0,5	3,7	131,4
61.3G	34 5/7	1230	353	624	176,8	149	0,9	0,7	4,9	79	0,1	0,8	8,4	80	2,3	2	20,6	87,2	2,9	0,2	2	7	0,4	0,5	3,7	142,9

Am: Amostras; IG: Idade gestacional em semanas; AIG: Adequado para idade gestacional; GIG: Grande para idade gestacional; PG: Pequeno para idade gestacional; M PT: Mãe de recém-nascido pré-termo; RN PT: Recém-nascido pré-termo; Transf: Taxa de transferência; LPS: lipopolissacarídeo

ANEXO 5

Níveis de IgG e IgM totais e específicos e taxas de transferência de IgG nas amostras de soro das mães e de seus respectivos recém-nascidos

			IgG T				LPS <i>Klebsiella</i> (µg/ml)				LPS O6 (µg/ml)				LPS O111 (µg/ml)				LPS O26 (µg/ml)				LPS <i>Pseudomonas</i> (µg/ml)			
Am	G	Peso (g)	M	RN	Trans (%)	IgM T M	IgG M	IgG RN	IgM M	Trans M (%)	IgG M	IgG RN	IgM M	Trans M (%)	IgG M	IgG RN	IgM M	Trans M (%)	IgG M	IgG RN	IgM M	Trans M (%)	IgG M	IgG RN	IgM M	Trans M (%)
2	39 1/7	3300	961	990	103	81	1,5	1,2	2,6	82,8	1,5	1,3	8,2	84,7	5,3	2,2	12,9	41,7	1,6	0,7	2,7	44,3	2,8	1,4	2,9	50
4	38	2180	1117	1109	99,3	163	0,5	0,3	4,7	69,5	0,1	0,1	12,3	131,5	1,6	1,8	19,2	110,4	0,3	0,4	2	105,9	0,3	0,3	4,3	100
5	38 6/7	2760	1028	1352	131,5	95	0,4	0,3	3,4	85,7	0,2	0,4	5,8	166,7	0,7	0,8	7,4	114,3	0,6	0,5	1,7	80,6	0,5	0,5	3,6	102,1
9	38 6/7	3390	745	1381	185,4	180	0,6	0,6	7	98,4	0,4	0,4	8,2	100	1	1,5	7,7	152,6	0,6	0,7	1,6	106,4	0,2	0,5	3,8	235
11	38 5/7	2840	905	1187	131,2	272	0,5	0,4	4,7	77,8	0,1	0,1	56,5	112,5	4	2,7	16,7	68,3	0,4	0,8	5,4	181,4	0,2	0,6	9,6	373,3
13	39 6/7	3740	1154	1248	108,2	228	1,1	0,5	8,6	47,6	0,2	0,2	33	71,4	2,5	0,7	72,1	28,3	25,6	10	9,3	39,1	0,4	0,4	11,2	102,7
15	40 5/7	3360	996	1428	143,4	191	0,8	1	4,5	129,3	0,3	0,4	16,6	116,1	3	2,6	27,1	87,2	2,2	1,7	2,9	79,1	0,4	0,5	7	135,1
16	38 5/7	3680	994	1210	121,7	129	0,7	0,5	4,1	72,6	0,1	0,1	10,2	118,8	4,5	4,1	21,6	90,2	0,9	0,8	4,3	89,4	0,5	0,4	5,4	91,1
17	38 3/7	3130	648	1001	154,5	148	0,4	0,5	5,1	128,6	0,2	0,2	6,2	141,2	2	1,2	22,4	60,5	0,6	0,8	3	132,8	0,2	0,2	5	115
18	41 6/7	3270	684	1083	158,3	115	0,3	0,4	5,8	148,2	0,7	0,7	3,9	90,3	3,2	3,3	7,9	103,1	0,1	0,2	1,4	164,3	0,2	0,4	4,1	190
19	37 4/7	2370	1005	1296	129	124	0,3	0,7	3,9	212,1	0,2	0,1	8,5	77,8	2	2,1	23,1	103,5	1,1	0,8	2	77,1	0,3	0,4	3,6	125
20	39 3/7	4900	804	881	109,6	95	0,8	1,3	2,3	170,5	0,1	0,1	3,8	78,2	1,5	1,3	9,4	89,7	1,8	1,7	3,1	94,4	0,1	0,1	2,2	120
22	40 6/7	3600	989	1103	111,5	144	0,9	0,7	8,1	78	1,9	1,1	8	59,8	4,6	5,1	15,8	110,2	0,5	0,7	3,6	128,3	0,5	0,5	6,5	97,8
23	39	3750	696	922	132,5	112	2,3	1,4	1,6	60,4	0,2	0,3	4,6	116,7	0,5	0,8	6	150	0,1	0,2	0,8	157,1	0,1	0,3	1,4	250
25	39	2460	810	948	117	645	0,8	0,5	32	61,7	0,3	0,1	27	56	3,7	3,2	50,5	85,4	1,4	1,3	22,8	90,1	0,2	0,2	10,6	133,3
26	38 2/7	3060	973	891	91,6	189	1,3	1,5	3,7	119,5	5,9	6,8	16,3	116,1	6,6	5,5	20,8	83,8	9,2	10	4,1	108,7	0,7	1,3	7,7	194
27	41 6/7	3780	1275	1338	104,9	265	0,8	0,7	6,8	81,3	0,2	0,2	19,3	116,7	9,1	5,8	41,5	63,7	3,4	1,8	4,1	52,9	0,2	0,2	8,2	127,7
28	40 6/7	2790	986	1020	103,4	126	2,7	1,6	2,3	59,3	0,4	0,3	3	68,3	1,5	1,2	17	81,3	3,8	2,5	0,9	66,7	0,5	0,5	2,1	100
29	38 4/7	3660	1035	901	87,1	152	0,6	0,4	4,7	55,6	0,4	0,2	11,8	62,9	1	0,9	7,8	85,7	0,6	0,6	2,2	107	0,4	0,5	8,3	125
30	37 4/7	3650	397	787	198,2	55	0,6	0,4	4,6	66,7	0,7	1	11,1	151,5	0,7	1,7	8	233,3	1,8	2,3	2,4	125	0,2	0,7	3,5	300
31	38 5/7	2990	891	1124	126,2	108	0,8	0,9	2,7	113,3	0,4	0,5	6,9	117,1	1,2	1,2	7,3	100	3,1	3,6	1,5	118	0,2	0,6	1,9	239,1
32	38 6/7	3640	1081	1189	110	161	0,7	0,7	7,8	92,9	0,4	0,4	12,5	107,5	2,6	1,7	37,1	63,4	1,6	0,9	2,5	58,3	0,2	0,3	8,1	165
36	38 3/7	2740	711	801	112,7	96	0,3	0,3	3,4	83,3	0,3	0,2	6,5	82,1	1,4	1,1	7,8	78,3	0,9	0,7	3,1	75,3	0,4	0,3	3,2	74,3
37	37 1/7	2500	915	1187	129,7	212	0,5	0,6	7,7	109,6	0,1	0,1	30,1	128,6	0,9	1,2	45,2	134,5	0,4	0,4	6,8	119,4	0,1	0,2	8,7	200
38	39 2/7	2870	855	1180	138	212	0,7	0,8	5,4	115,4	2,2	2,4	17,7	105,8	7,5	11,8	34,7	156,7	5,6	4,6	4,6	82,1	0,4	0,4	7	95,4
39	38 2/7	3300	805	968	120,3	60	2	1,4	4,1	71	0,6	0,7	6,8	112,7	0,6	1,1	10	173,8	1,9	1,4	3,4	77,3	0,2	0,4	4	190,5
43	40 1/7	3885	755	1180	156,3	120	0,2	0,2	2,7	100	0,1	0,2	6,6	237,5	0,9	1,3	16,2	144,3	1,4	1,8	4	123,2	0,2	0,3	3,3	130
44	40	3460	1402	1298	92,6	286	0,2	0,8	5,4	325	0,2	0,3	17,4	116,7	2,4	2,4	46,4	101,3	4,4	3	4,8	68,9	0,4	0,4	8	107,9
45	37 6/7	2490	978	1003	102,6	118	0,6	0,5	3,5	96,4	0,8	0,6	11,4	72,5	4,2	2,7	18,4	64,6	1,8	1,8	2,5	100	0,2	0,3	4,6	125
57	38	2935	441	810	183,7	338	0,7	1,2	7,8	178	1,2	0,5	49,4	37,8	0,8	1	27,1	124,1	0,8	0,8	5,7	95	0,4	1,2	8,4	300
58	37 3/7	2000	567	431	76	353	1,5	1,9	4,7	131	0,5	1,2	11,5	251,1	6,5	3,8	28,7	58,2	4,2	2,8	1,7	67,4	0,6	1,9	5	316,7
59	40 1/7	2180	607	685	112,9	144	1,1	1	3,4	86,7	0,6	0,5	11,2	81,4	3,4	1,7	10,4	49,3	1,6	1,3	1,42	79,8	0,6	1,2	3,1	218,2

Am: Amostras; IG: Idade gestacional em semanas; AIG: Adequado para idade gestacional; GIG: Grande para idade gestacional; PG: Pequeno para idade gestacional; M PT: Mãe de recém-nascido pré-termo; RN PT: Recém-nascido pré-termo; Transf: Taxa de transferência; LPS: Iipopolissacarídeo

Anexo 6

Reagentes Utilizados no ELISA

TAMPÃO PBS PH 7,4

Fosfato bibásico de sódio anidro	17,91 g
Cloreto de sódio (Reagen)	8,8 g
Água destilada q.s.p	1000 ml
Acertar pH 7,4 com HCL 6N	

TAMPÃO PARA DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS E DO CONJUGADO(PBS NACL-T)

Cloreto de sódio (Reagen)	2 g
Tween 20(Sigma P-1379)	0,2 g
PBS 7,4	100 ml
Tampão de Lavagem	
Tween 20(Sigma P-1379)	0,5 ml
PBS 7,4	1000 ml

TAMPÃO CITRATO FOSFATO

Ácido cítrico(Merk 21549)	7,4 g
Fosfato de sódio bibásico (Qeel)	9,9 g
Água destilada q.p.s	1000 ml
Acertar pH para 5,0 e separar em alíquotas de 100 ml e guardar congelado.	

SOLUÇÃO DE SUSTRATO COM OPD

O-Phenylenediamine Dihydrochloride (sigma P-8287)	10 mg
Tampão citrato fosfato	25 ml
Perhydrol 30% (Merk 7209)	10µl

Anexo 7
Imunodifusão radial quantitativa (IDQR)

Agarose	1g
PBS 7,4	100 ml

Aquecer até fusão, em banho-maria, e a seguir transferir para banho até 57°C até estabilização da temperatura. Par cada 6ml de agarose 1%, são colocados anti-IgM e IgG humano desenvolvido e carneiro(Sigma), 30µl e 70µl respectivamente, e essa solução é transferida para placas de vidro, separadas por espaçador. Após solidificação, a agarose é perfurada e as amostras aplicadas. A seguir, são incubadas em câmara úmida a 4°C por 72 e 48 horas, IgM e IgG respectivamente. Após este período medir os diâmetros dos halos de precipitação e construir um gráfico para obtenção dos resultados através da curva padrão.