

RENATA DE ARAÚJO MONTEIRO

**Evolução neonatal e aquisição passiva de anticorpos
IgG séricos e IgA no colostro reativos com
Streptococcus B, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*
e *Pseudomonas aeruginosa* em gêmeos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Jornada Krebs

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Monteiro, Renata de Araújo

Evolução neonatal e aquisição passiva de anticorpos IgG séricos e IgA no colostro reativos com *Streptococcus B*, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* em gêmeos / Renata de Araújo Monteiro. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientador: Vera Lúcia Jornada Krebs.

Descritores: 1.Recém-nascido 2.Gêmeos 3.Colostro 4.Imunoglobulina G
5.Imunoglobulina A secretora 6.*Streptococcus agalactiae* 7.*Klebsiella pneumoniae*
8.*Pseudomonas aeruginosa* 9.Sepse

USP/FM/DBD-383/16

Dedicatória

*A meu querido marido **Rafael**,
que enche minha vida de amor!*

*A meus amados filhos **Fernanda e Rafael**,
razão maior de minha existência!*

*A meus pais, **Augusto e Evy**,
que me ensinaram que o estudo é o caminho para
melhorar o mundo, e, por meio do exemplo, sempre
me estimularam a ser uma pessoa melhor.*

*A meu irmão gêmeo **Augusto**,
meu primeiro e melhor amigo.*

Agradecimientos

A Deus, por ter sempre iluminado meu caminho.

A minha família, porto seguro, fonte de inspiração e apoio incondicional.

Aos recém-nascidos e suas famílias, razão de meu estudo.

Em especial, a minha orientadora Profa. Dra. Vera Lúcia Jornada Krebs, meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este estudo, meu respeito e admiração pela sua capacidade de orientação e sabedoria e minha gratidão pela sua paciência confiança e incentivo.

A meu sogro Kozi Yoshida e minha sogra Rosa Maria Yoshida, a quem tenho como pais e minhas cunhadas Juliana Yoshida Nieri e Vanesa Ana Bieluczyk Monteiro, a quem tenho como irmãs.

A meus sobrinhos Guilherme Yoshida Nieri, Bruna Yoshida Nieri, Henrique de Araújo Bieluczyk Monteiro e Pietro de Araújo Bieluczyk Monteiro, que tanto amo, e a meu cunhado Giuliano Nieri, com vocês me sinto feliz!

A minha querida Severina Maria da Conceição (Nina), que cuida de mim e de minha família com dedicação, carinho e amor.

A minha prima Andrea Cabral, amiga de todas as horas.

Ao Prof. Dr. Werther Brunow de Carvalho, pelo apoio e incentivo.

À Profa. Dra. Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio, pela valiosa contribuição na realização deste estudo.

À equipe do LIM 36, em especial, à Dra. Patricia Palmeira, por sua generosidade, capacidade de compartilhar conhecimento e análise das amostras.

À equipe de médicos assistentes do Centro Neonatal do Instituto da Criança do HCFMUSP, que compartilham comigo o cuidado diário dos recém-nascidos e suas famílias. Tenho muito orgulho de compor esta equipe!

As minhas companheiras de plantão Daniela Matos Fiorenzano e Glenda Beozzo, minhas amigas, sou muito feliz em tê-las em minha vida, sem o apoio de vocês, eu não teria conseguido.

À amiga Maria Augusta Gibelli, pelo estímulo e incentivo durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À Dra. Valdenise Tuma Calil, pela torcida e incentivo.

A Laura Cardoso, Patricia Prado Durante, Roberta Berardi, Romy Schmidt, Luciana de Carvalho e Fabíola Marim. Sou muito grata pela nossa amizade e pelos ensinamentos que recebi de vocês.

Aos amigos Tamara Strauss, Luiza Visconti, Letícia Correa da Silva, Fernanda Marques de Deus, Adriana Pouza, Carlos Eduardo Baldo Carlomagno e Raquel Santos Ferreira, muito obrigada pela ajuda na coleta das amostras e pela ajuda nos plantões.

À Dra. Alice D'Agostini Deutsch, pelas oportunidades de desenvolvimento pessoal, incentivo e amizade.

À querida equipe multiprofissional do Centro Neonatal do Instituto da Criança do HCFMUSP, em especial, Marinalva Souza Cruz e Ana Lúcia Reis Souza que, com disponibilidade e alegria, me ajudaram no encaminhamento das amostras ao laboratório.

Ao Sr. Rogério Ruscitto do Prado, pela assessoria estatística.

À Sra. Mariza Kazue Umetsu Yoshikawa, pela revisão das referências.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este estudo e minha formação profissional.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis

Normatização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	15
3 MÉTODOS.....	17
3.1 Aprovação no Comitê de Ética.....	18
3.2 Casuística.....	18
3.3 Métodos.....	21
3.4 Delineamento do estudo.....	27
3.5 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS.....	30
4.1 Análise Descritiva da Amostra.....	31
4.2 Concentração de anticorpos séricos IgG totais e específicos anti- <i>Streptococcus</i> B, anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
4.3 Concentrações de anticorpos IgA totais e específicos no colostro.....	43
4.4 Análise dos anticorpos no grupo de recém-nascidos com infecção.....	51
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÕES.....	71
7 ANEXOS.....	75
8 REFERÊNCIAS.....	77

Listas

Lista de Abreviaturas

EGB	<i>Streptococcus agalactie</i> do grupo B
Gem	gemelar
IG	idade gestacional
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
sem	semana(s)

Lista de Símbolos

%	porcentagem
<	menor que
±	mais ou menos
≥	maior ou igual
cm	centímetros
Da	dalton
g	grama
Kg	kilograma
KDa	Kilodalton
µg	micrograma
mg	miligrama
mL	mililitro
°C	graus Celsius
UA	unidades arbitárias

Lista de Siglas

BHI	<i>brain heart infusion</i>
BPM	batimentos por minuto
CTIN	Centro de Terapia Intensiva Neonatal
DO	densidade óptica
EEG	equações de estimulação generalizadas
ELISA	imunoensaio enzimático
FcRn	receptor Fc neonatal
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
LIM 36	Laboratório de Investigação Médica 36
LPS	lipopolissacarídeo
N	número
nv	nascido vivo
PBS	solução salina tamponada com fosfato pH 7,4
PBS-T	solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 acrescida de Tween 20 a 0,1%
RN	recém-nascido(s)
RNT	recém-nascido a termo
RNPT	recém-nascido prematuro
RPM	rotações por minuto
SIRS	síndrome da resposta inflamatória sistêmica

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Caracterização demográfica de 57 mães e de 114 recém-nascidos gemelares.....	32
Tabela 2 -	Estatística descritiva da idade gestacional, peso de nascimento e tempo de internação de 114 recém-nascidos gemelares.....	33
Tabela 3 -	Estatística descritiva das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos anti- <i>Streptococcus</i> B, anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e anti-LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no cordão umbilical de recém-nascidos gemelares.....	34
Tabela 4 -	Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos de recém-nascidos gemelares, conforme peso e ordem de nascimento.....	35
Tabela 5 -	Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos de recém-nascidos gemelares, conforme o gênero.....	36
Tabela 6 -	Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos de recém-nascidos gemelares, conforme a classificação gestacional.....	37
Tabela 7 -	Comparação das concentrações de anticorpos séricos IgG anti-LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de recém-nascidos gemelares, conforme a classificação gestacional.....	38
Tabela 8 -	Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos de recém-nascidos gemelares de termo e prematuros.....	39
Tabela 9 -	Estatística descritiva das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos de recém-nascidos gemelares e comparação a partir da idade gestacional de 34 semanas.....	40
Tabela 10 -	Estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgA totais e específicos no colostro de 51 mães de gemelares.....	44
Tabela 11 -	Estatística descritiva das concentrações de anticorpos maternos IgA totais e reativos com <i>Streptococcus</i> B de acordo com a colonização vaginal para <i>Streptococcus</i> B.....	45

Tabela 12 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos IgA totais e específicos no colostro das mães de recém-nascidos gemelares de termo e prematuros.....	46
Tabela 13 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos IgA totais e específicos no colostro das mães, a partir da idade gestacional de 34 semanas de gestação.....	47
Tabela 14 - Estatística descritiva das características de recém-nascidos gemelares com sepse tardia com hemocultura positiva e concentrações de anticorpos IgG séricos e IgA do colostro	52
Tabela 15 - Estatística descritiva das características de dois recém-nascidos gemelares com infecção e hemocultura negativa e concentrações de anticorpos IgG séricos e IgA do colostro	53
Tabela 16 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de IgA totais e específicas no colostro, conforme a presença de sepse neonatal em alguns dos recém-nascidos	54
Tabela 17 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos dos recém-nascidos, conforme a presença de sepse	55
Tabela 18 - Análise da ocorrência de sepse neonatal, conforme a ingestão de colostro.....	56

Lista de Gráficos

- Gráfico 1** - Concentrações de anticorpos séricos IgG totais de recém-nascidos gemelares, conforme a idade gestacional 41
- Gráfico 2** - Concentrações de anticorpos séricos IgG anti-*Streptococcus* B de recém-nascidos gemelares, conforme a idade gestacional..... 42
- Gráfico 3** - Concentrações de anticorpos séricos IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* de recém-nascidos gemelares, conforme a idade gestacional..... 42
- Gráfico 4** - Concentrações de anticorpos séricos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* de recém-nascidos gemelares, conforme a idade gestacional..... 43
- Gráfico 5** - Concentrações de anticorpos IgA totais no colostro das mães, conforme a idade gestacional 48
- Gráfico 6** - Concentrações de anticorpos IgA anti-*Streptococcus* B no colostro das mães, conforme a idade gestacional 49
- Gráfico 7** - Concentrações de anticorpos IgA anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* no colostro das mães, conforme a idade gestacional 49
- Gráfico 8** - Concentrações de anticorpos IgA anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* no colostro das mães, conforme a idade gestacional..... 50

Resumo

Monteiro RA. *Evolução neonatal e aquisição passiva de anticorpos IgG séricos e IgA no colostro reativos com Streptococcus B, anti-LPS de Klebsiella pneumoniae e Pseudomonas aeruginosa em gêmeos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Gestações múltiplas apresentam alta morbidade relacionada a fatores como prematuridade, baixo peso ao nascer e sepse. Em gemelares, a aquisição de imunidade passiva por meio do cordão umbilical e do colostro ainda não é bem conhecida. O objetivo geral do estudo foi descrever a concentração de IgG total e específico anti-*Streptococcus B*, antilipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* e antilipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* no cordão umbilical de recém-nascidos gemelares e a concentração de IgA secretora total e específica destes anticorpos no colostro. O objetivo específico foi analisar a associação entre infecção neonatal e concentração dos anticorpos no sangue de cordão umbilical e no colostro. **Métodos:** estudo prospectivo transversal de uma coorte de recém-nascidos gemelares internados no Centro Neonatal do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP no período de 20 meses. Foram excluídos: recém-nascidos com malformação; mães com infecção ou imunodeficiência. Variáveis analisadas: idade gestacional; peso de nascimento; classificação gestacional; concentrações de IgG total e específicos e IgA total e específicas anti-*Streptococcus B*, antilipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* e antilipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* no sangue de cordão umbilical e no colostro; nutrição enteral; episódios de infecção; desfecho. As dosagens de IgG total foram realizadas por nefelometria e dos demais anticorpos através de ensaio imunoenzimático. Os testes t-Student pareado ou teste de Wilcoxon pareado, teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis, foram utilizados, considerando-se significante $p < 0,005$. **Resultados:** Foram incluídos 57 pares de gêmeos, compondo a casuística de 114 recém-nascidos. A idade gestacional foi $36 \pm 1,65$ semanas (média \pm DP) e o peso de nascimento foi $2.304,8 \pm 460$ g (média \pm DP). As concentrações de anticorpos encontradas foram (média \pm DP): IgG total $835,71 \pm 190,73$ mg/dL, IgG anti-*Streptococcus B* $295,1 \pm 250,66$ UA/mL, IgG antilipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* $280,04 \pm 498,66$ UA/mL e IgG antilipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* $504,75 \pm 933,93$ UA/mL; IgA total $210,2 \pm 285,3$ g/L, IgA anti-*Streptococcus B* $6640 \pm 9526,8$ UA/mL, IgA antilipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* $3231,0 \pm 2935,2$ UA/mL, IgA antilipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* $3070,1 \pm 2886,6$ UA/mL. A concentração de IgG total foi menor nos recém-nascidos prematuros ($p < 0,001$). Em gemelares com idade gestacional < 34 semanas a concentração de IgG total ($p = 0,013$) e IgG antilipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* ($p = 0,032$) foi menor. A concentração de anticorpos IgG antilipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* foi menor nos recém-nascidos pequenos para a idade gestacional ($p = 0,013$). No colostro, houve detecção de IgA total, IgA anti-*Streptococcus B*, IgA antilipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* e antilipopolissacarídeos

de *Pseudomonas aeruginosa* em 98,1% das mães. A concentração de IgA antilipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* foi menor no colostro das mães de recém-nascidos prematuros ($p=0,013$). A concentração de IgA antilipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* foi menor no colostro das mães com parto antes de 34 semanas ($p=0,001$). Houve infecção em cinco recém-nascidos, cuja concentração de IgG total foi menor ($p<0,05$). Os neonatos que receberam colostro apresentaram menor incidência de infecção ($p < 0,001$). **Conclusões:** Os anticorpos IgG total e específicos foram detectados no sangue do cordão umbilical em todos os gemelares, comprovando sua passagem transplacentária. Houve diminuição significativa na concentração de anticorpos IgG total nos gemelares prematuros e de IgG total e IgG antilipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* nos gemelares com idade gestacional inferior a 34 semanas. No colostro houve detecção de IgA total e específica em 98,1% das mães. A concentração de IgA anti-lipopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* foi menor no colostro das mães de gemelares prematuros. Nas mães com parto antes de 34 semanas houve diminuição da concentração de IgA antilipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae*, sugerindo que a prematuridade possa ter influenciado a transferência de anticorpos maternos pelo colostro. A maior incidência de infecção no grupo de recém-nascidos, que não receberam colostro e naqueles que apresentavam concentração sérica de IgG total significativamente menor, reforça a importância da proteção anti-infecciosa conferida pela imunidade passiva transferida da mãe.

Descritores: 1. Recém-nascido; 2. Gêmeos; 3. Colostro; 4. Imunoglobulina G; 5. Imunoglobulina A secretora; 6. *Streptococcus agalactiae*; 7. *Klebsiella pneumoniae*; 8. *Pseudomonas aeruginosa*; 9. Sepsis;

Abstract

Monteiro RA. *Neonatal outcome and passive acquisition of serum IgG antibodies and IgA in the colostrum reactive with Streptococcus agalactiae, anti-LPS of Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa in twins* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Introduction: Multiple pregnancies have high morbidity related to factors such as prematurity, low birth weight and sepsis. In twins, acquisition of passive immunity through the umbilical cord and colostrum is not yet known. The overall aim of the study was to describe the concentration of total and specific IgG antibodies anti-*Streptococcus* B, anti-lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* and anti-lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* in the umbilical cord of newborn twins and the concentration of total and specific secretory IgA antibodies in the colostrum. The specific aim was to analyze the association between neonatal infection and antibody concentration in the umbilical cord blood and colostrum. **Methods:** A prospective cross-sectional study of a cohort of newborn twins admitted to the Neonatal Center of Children’s Institute, University of São Paulo during the period of 20 months. Patients with malformations and mothers with infection or immunodeficiency were excluded from our analysis. Variables analyzed: gestational age; birth weight; sex; gestational classification; antibody concentrations of total and specific IgG and IgA anti-*Streptococcus* B, anti-lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* and anti-lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* in umbilical cord blood and colostrum; enteral nutrition; infection episodes; outcome. Total IgG measurements were performed using nephelometry and the specific antibodies were evaluated by enzyme immunoassay. We used paired Student t test or Wilcoxon test, Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test considering significant $p < 0.005$. **Results:** During the study period a total of 57 pairs of twins were included, making the sample of 114 newborns. Gestational age was 36 ± 1.65 weeks (mean \pm SD) and birth weight was 2304.8 ± 460 g (mean \pm SD). We found the following antibody concentrations (mean \pm SD): total IgG 835.71 ± 190.73 mg/dL, anti-*Streptococcus* B IgG 250.66 ± 295.1 AU/mL, anti-lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* IgG 280.04 ± 498.66 AU/mL and anti-lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* IgG 504.75 ± 933.93 AU/mL; total IgA 210.2 ± 285.3 g/L, anti-*Streptococcus* B IgA 6640 ± 9526.8 AU/mL, anti-lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* IgA 3231.0 ± 2935.2 AU/mL, anti-lipopolysaccharide *Klebsiella pneumoniae* IgA 3070.1 ± 2886.6 AU/mL. The concentration of total IgG was lower in preterm infants ($p < 0.001$). In twins with gestational age < 34 weeks both total IgG concentration ($p = 0.013$) and anti-lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* IgG concentration ($p = 0.032$) were lower. The concentration of anti-lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* IgG was lower in small for gestational age newborns ($p = 0.013$). There was detection of total IgA and specific antibodies in the colostrum of 98.1% mothers. The concentration of anti-lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* IgA was lower in the colostrum of premature’s mothers ($p = 0.013$). The concentration of anti-lipopolysaccharide of

Klebsiella pneumoniae IgA was lower in the colostrum of mothers with delivery before 34 weeks ($p = 0.001$). Five newborns were diagnosed with sepsis and in this group the concentration of total IgG was lower ($p < 0.05$). Neonates receiving colostrum had a lower incidence of infection ($p < 0.001$).

Conclusion: This study showed detection of total and specific IgG antibodies in umbilical cord blood for all twin newborn, proving its transplacental passage. There was a significant decrease in the concentration of total IgG antibodies in premature twins and anti-lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* IgG in twins with gestational age less than 34 weeks. There was detection of total and specific IgA in the colostrum of 98.1% mothers. The concentration of anti-lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* IgA was lower in mothers of premature twins. Among the newborns with gestational age less than 34 weeks there was a decrease in the concentration of anti-lipopolysaccharide *Klebsiella pneumoniae* IgA, suggesting that prematurity may have influenced the transfer of maternal antibodies through colostrum. The highest incidence of infection in the newborn group who did not receive colostrum and in those who had significantly lower total IgG serum antibodies reinforces the importance of anti-infectious protection afforded by passive immunity transferred from the mother.

Descriptors: 1. Infant, newborn; 2. Twins; 3. Colostrum; 4. Immunoglobulin G; 5. Immunoglobulin A, Secretory; 6. *Streptococcus agalactiae*; 7. *Klebsiella pneumoniae*; 8. *Pseudomonas aeruginosa*; 9. Sepsis;

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

No início da vida, o neonato, cujo sistema imunológico ainda não está totalmente desenvolvido, é mais vulnerável às infecções. Sabe-se que a aquisição passiva de anticorpos da mãe para o feto, por meio do cordão umbilical e, a seguir, para o recém-nascido, pelo colostro, é fundamental para a proteção anti-infecciosa ⁽¹⁾. O conhecimento detalhado dos processos de transferência de anticorpos pelo sangue ou pelo leite materno é altamente desejável para que sejam desenvolvidas estratégias capazes de prevenir e reduzir as morbidades e mortalidades relacionadas às infecções no período neonatal.

O sistema imune consiste em uma organização de células e moléculas com funções especializadas para defender o organismo contra infecções e manter a homeostase dos órgãos e tecidos, impedindo o desenvolvimento de células neoplásicas. A resposta aos microrganismos invasores pode ser inata ou adaptativa ⁽²⁾.

A resposta inata é constituída por mecanismos protetores que representam a linha de frente na defesa imunológica. Os padrões moleculares associados a patógenos são reconhecidos por meio de receptores, dentre eles, os do tipo Toll. Não exige exposição prévia ao patógeno e apresenta sempre a mesma intensidade, independentemente do número de exposições ao agente. Participam da resposta inata: as barreiras naturais constituídas pela pele, pelo epitélio respiratório, gastrointestinal e outras mucosas; as células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e

macrófagos); as células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e as células *natural Killer*. Os componentes moleculares desta resposta incluem o complemento, as proteínas de fase aguda e as citocinas ^(2, 3).

A resposta adaptativa, em contraste, aumenta quando há exposição repetida ao agente, ou seja, produz memória imunológica. Desta forma, sua intensidade será cada vez maior na ocorrência de reinfecção. É gerada pela proliferação de linfócitos B e T específicos para um determinado antígeno. Ocorre síntese e secreção de imunoglobulinas específicas para cada antígeno. Estes anticorpos são os responsáveis pela ativação de mecanismos que culminam com a eliminação do microrganismo ^(2, 3).

O sistema imune neonatal apresenta particularidades necessárias ao período de transição do ambiente intrauterino para o extrauterino. O feto e o neonato têm exposição antigênica limitada para induzir a imunidade adaptativa. A competência imunológica do recém-nascido progride rapidamente nos primeiros meses de vida, com a maturação das células envolvidas na resposta adaptativa e a experiência antigênica adquirida ^(4, 5).

O recém-nascido precisa ser capaz de iniciar uma resposta inflamatória eficiente para garantir proteção contra infecção, e, ao mesmo tempo, permitir o desenvolvimento de colonização sem que ocorra inflamação exacerbada em resposta à mesma. O sistema imune neonatal caracteriza-se pela menor ativação macrofágica e menor produção de anticorpos responsáveis pela opsonização, resultando em aumento da susceptibilidade à infecção por patógenos intracelulares e diminuição da

resposta às vacinas ⁽⁴⁻⁸⁾. Portanto, no início da vida, o neonato depende dos componentes da resposta inata e da aquisição passiva dos anticorpos da mãe ^(4, 5).

Os anticorpos ou imunoglobulinas são um grupo de glicoproteínas detectáveis no plasma, fluidos corpóreos e superfícies mucosas capazes de reconhecer e ligar-se a antígenos específicos. Existem cinco classes conhecidas de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que apresentam diferentes funções e locais de ação. As moléculas de IgG são subdivididas em quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e as moléculas de IgA são subdivididas em duas subclasses IgA1 e IgA2 ⁽⁹⁾.

A estrutura de uma molécula de imunoglobulina é formada por um par de cadeias pesadas e um par de cadeias leves idênticas ligadas por pontes dissulfeto. As cadeias pesadas determinam a classe da imunoglobulina, de acordo com a sequência de aminoácidos. A imunoglobulina apresenta duas regiões denominadas constante e variável. A primeira determina as funções efetoras do anticorpo e a região variável determina a especificidade para cada antígeno ⁽¹⁰⁾.

A IgG é a classe de imunoglobulina com maior concentração no sangue. Suas principais funções são a opsonização de bactérias e a neutralização de vírus ⁽¹¹⁾. A importância da contribuição da IgG para a imunidade pode ser constatada clinicamente em pacientes que apresentam hipogamaglobulinemia associada a infecções recorrentes ⁽¹⁰⁾.

Há relatos antigos sobre a transferência de imunidade da mãe para o recém-nascido. Em 1846, durante uma epidemia de sarampo nas Ilhas

Faroé, foi observado que os filhos das gestantes que sobreviveram ao sarampo não foram infectados. Em 1879, notou-se que a imunização materna com o vírus vaccínia protegeu o recém-nascido contra a varíola ⁽¹²⁾.

O transporte de substâncias por meio da placenta é fundamental para o crescimento e desenvolvimento normal do feto. Para que este mecanismo ocorra, a substância precisa atravessar uma barreira histológica composta por duas camadas, o sinciciotrofoblasto e o endotélio dos capilares fetais. Muitas moléculas de baixo peso molecular (<500 Da), como aminoácidos e íons são difundidas pela placenta, porém, aquelas de alto peso molecular, geralmente, não a atravessam. A IgG materna tem peso molecular de, aproximadamente, 160KDa e é ativamente transferida ao feto por meio de endocitose. Esse processo é mediado pelo receptor Fc neonatal (FcRn) e pelo pH do meio ^(13, 14, 15). Quanto mais ácido for o pH do meio, maior será a afinidade da IgG pelo FcRn. A molécula de IgG presente na circulação sanguínea materna liga-se ao receptor FcRn no sinciciotrofoblasto, sendo internalizada em um endossomo. Para garantir a alta afinidade entre o receptor FcRn e a molécula de IgG e proteção contra a ação de enzimas lisossomais, o endossomo é acidificado. Quando a vesícula atinge a circulação fetal, encontra pH fisiológico e libera a molécula de IgG para o feto ^(14, 15).

A passagem transplacentária de anticorpos IgG sofre influência da concentração destas imunoglobulinas maternas, da subclasse de IgG e da idade gestacional. Essa passagem tem início ao redor de 13 semanas e aumenta até o terceiro trimestre ^(14, 15). Malek et al. ⁽¹⁶⁾ encontraram um

aumento médio da concentração de anticorpos séricos IgG totais no feto de $1,4 \pm 0,7$ g/L entre 17 e 22 semanas (aproximadamente, 10% da concentração materna) para $5,6 \pm 1,1$ g/L entre 28 e 32 semanas (aproximadamente, 50% da concentração materna). Esse aumento da passagem de anticorpos continua a ocorrer no terceiro trimestre, com concentração de IgG fetal próxima ou superior à materna no final da gestação ^(14, 15, 16).

A única classe de imunoglobulina, que é transportada significativamente pela placenta, é a IgG. Observa-se a passagem preferencial da subclasse IgG1, seguida por IgG4 e IgG3, e com passagem menos eficiente para IgG2, cuja concentração sérica aproximada é 60% da concentração materna no recém-nascido a termo ^(14, 15, 17). A IgG é o anticorpo sérico predominante em todas as idades. Em adultos, a subclasse IgG1 representa 70% da concentração total de IgG, e as IgG2, IgG3 e IgG4 representam, respectivamente, 20%, 7% e 3% ^(18, 19). A concentração de anticorpos da classe IgG no recém-nascido decorre quase integralmente da aquisição passiva via transplacentária. Como a meia vida da IgG é de, aproximadamente, 21 dias, a concentração sérica desse anticorpo diminui, rapidamente, após o nascimento com nadir ao redor do quarto mês de vida. Após o nascimento, o recém-nascido começa a sintetizar seu próprio anticorpo da classe IgG, sendo mais precoce a capacidade de formar anticorpos dirigidos a antígenos proteicos das subclasses IgG1 e IgG3, que ocorre por volta dos 2 meses de vida. A síntese de anticorpos da subclasse IgG2 dirigidos a polissacarídeos ocorre somente por volta dos 2 anos de

vida, podendo ser ainda mais tardia para determinados polissacarídeos ^(3, 20).

Além da passagem transplacentária de IgG, a aquisição passiva de anticorpos IgA secretores por meio do colostro confere imunidade ao neonato. Sabe-se que a taxa de mortalidade por doenças infecciosas em neonatos e lactentes que recebem leite materno é seis vezes menor em relação àqueles alimentados com fórmula ⁽²¹⁾.

O colostro é rico em proteínas, imunoglobulinas e componentes imunomoduladores, que exercem importante papel protetor contra infecções nos primeiros dias de vida. No colostro, são identificados componentes, como fatores de crescimento, lactoferrina, citocinas anti-inflamatórias, oligossacarídeos, antioxidantes, pré e probióticos, leucócitos e anticorpos ^(22, 23). Nos primeiros dias após o nascimento, as junções do epitélio mamário estão mais espaçadas, favorecendo o transporte paracelular de mais componentes imunológicos da circulação materna para o leite. Estas junções epiteliais fecham-se no período da apojadura, tornando o leite maduro diferente do colostro quanto à concentração de componentes imunológicos ^(22, 23).

A imunoglobulina mais importante do leite humano é a IgA secretora, produzida pelos linfócitos que migraram do intestino materno e outras mucosas para as glândulas mamárias (circulação broncoenteromamária). Por esta razão, esta imunoglobulina reflete o repertório antigênico ao qual a mãe foi exposta ^(24, 25). Acredita-se que os componentes imunológicos modifiquem-se, de acordo com a exposição da mãe aos antígenos, sendo muito importante a presença da mãe na unidade neonatal e o incentivo ao

contato pele a pele com seu filho. Desta forma, o leite da própria mãe torna-se uma proteção única, específica para o recém-nascido, no ambiente em que ambos se encontram ⁽²⁵⁾.

A IgA secretora atua na defesa das superfícies mucosas por meio de três mecanismos de ação principais: neutralização intracelular, excreção viral e exclusão imune. A neutralização intracelular ocorre quando a IgA secretora passa por transcitose pelas células basolaterais da superfície mucosa e encontra endossomos contendo partículas virais, fenômeno este descrito para vírus do sarampo e HIV ^(26, 27). Na excreção viral, formam-se imunocomplexos de anticorpo e vírus que estavam na submucosa e são excretados no lúmen. A exclusão imune é obtida pela aglutinação, aprisionamento e excreção do antígeno, com consequente inibição da aderência de microrganismos e toxinas à superfície mucosa ^(26, 27).

A principal função da IgA secretora é ligar-se aos patógenos que atingem as membranas mucosas, prevenindo a invasão aos tecidos. Dessa forma, a indução da resposta inflamatória por meio da ativação de neutrófilos, macrófagos e produção de citocinas não ocorre ⁽²⁸⁾.

Conforme a Organização Mundial de Saúde, a mortalidade neonatal é responsável por 44% da mortalidade nas crianças até 5 anos de idade no mundo ⁽²⁹⁾. Dentre as principais causas de mortalidade neonatal, citam-se a prematuridade e suas complicações (33%), as condições relacionadas ao parto (24%) e as infecções (20%). A maioria dos óbitos (80%) ocorre em recém-nascidos com peso de nascimento inferior a 2.500g ^(29, 30).

A gestação gemelar apresenta maior morbidade neonatal quando comparada à gestação única, pois está associada à maior incidência de baixo peso, prematuridade e restrição de crescimento intrauterino. Com o avanço das técnicas de reprodução assistida, tem-se observado um aumento progressivo do número de recém-nascidos gemelares nas unidades de terapia intensiva neonatal. Em países desenvolvidos, a gestação gemelar acontece entre 2% e 4% dos nascimentos, tendo sido observado um aumento de 76% entre os anos de 1980 e 2009 ⁽³¹⁾. Nos Estados Unidos da América, em 2014, a taxa de gemelaridade foi 33,9:1.000 nascidos vivos (nv), com idade materna média no primeiro parto de 26,3 anos ⁽³²⁾. A incidência de prematuridade é estimada em 58% nas gestações gemelares e 11% nas gestações únicas ⁽³³⁾. No Centro Neonatal do ICr-HCFMUSP, a taxa de prematuridade situa-se em torno de 29% e a de gemelaridade em 7%. Em 2007, entre 2.062 nv, 6,7% foram provenientes de gestações múltiplas, sendo 64% destes prematuros, enquanto a taxa de prematuridade entre os não gemelares foi 28,4%. Na comparação com recém-nascidos únicos, os gemelares apresentaram frequência significativamente maior de baixo peso ao nascer (73,4% *versus* 24,6%); muito baixo peso ao nascer (14,4% *versus* 5,1%) e mortalidade (7,9% *versus* 3,7%). Analisando-se a mortalidade por faixa de peso de nascimento, verificou-se associação significativa entre gemelaridade e óbito entre os recém-nascidos com peso inferior a 1.000 g ⁽³⁴⁾.

A prematuridade e o baixo peso ao nascer, mais frequentes em gêmeos, destacam-se entre principais fatores de risco para aquisição de

infecção após o nascimento. Em uma coorte de 6.956 recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer, a ocorrência de sepse foi inversamente proporcional ao peso de nascimento e à idade gestacional. A incidência de sepse tardia observada foi 21%, com maior mortalidade no grupo com infecção (18% x 7%), especialmente, quando a sepse era causada por bactéria gram-negativa (36%) ou fungo (32%)⁽³⁵⁾.

A sepse neonatal é didaticamente dividida em precoce e tardia, de acordo com a época de aparecimento dos sintomas. Esta classificação é útil para guiar o tratamento e contribui na identificação dos diferentes mecanismos fisiopatológicos e agentes etiológicos associados ao processo infeccioso⁽³⁶⁾.

A sepse neonatal precoce é aquela com aparecimento nas primeiras 72 horas de vida e, geralmente, resulta da transmissão vertical do agente infeccioso pela mãe no período periparto⁽³⁷⁾. Apresenta incidência de 0,9-1,5:1.000 nv e está associada a fatores de risco, como prematuridade, baixo peso ao nascer, colonização materna pelo *Streptococcus* do grupo B (EGB), rotura de membranas amnióticas por período superior a 18 horas, infecção urinária materna, gemelaridade, corioamnionite e febre materna intraparto^(38, 39). Os principais agentes etiológicos envolvidos na sepse precoce são o *Streptococcus* do grupo B, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella* sp e outras bactérias gram-negativas^(39, 40). Um estudo comparando a etiologia da sepse precoce nos períodos entre 1996 e 2004 e 2005 e 2012 mostrou

aumento na incidência de bactérias gram-negativas no segundo período, sobretudo na presença de bolsa rota por tempo superior a 7 dias ⁽⁴¹⁾.

A sepse neonatal tardia é caracterizada pelo início dos sintomas após 72 horas de vida e está relacionada à transmissão horizontal, com patógenos do ambiente hospitalar. Apresenta incidência entre 3 e 3,7 casos/1.000 nv e está associada à prematuridade, baixo peso ao nascer, quebra de barreiras naturais (pele e mucosa), uso de cateter vascular, procedimentos invasivos, nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso prolongado de antibióticos e administração de bloqueador do receptor H₂ ou bomba de próton ^(37, 38). Os principais agentes etiológicos envolvidos na sepse tardia são o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativo*, *Klebsiella* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp e *Candida* sp ^(39, 42).

O *Streptococcus* do grupo B é um diplococo gram-positivo, β hemolítico, encapsulado, geralmente, encontrado no sistema digestório e genital de adultos e sistema respiratório em recém-nascidos. Apresenta dez sorotipos descritos, baseados em suas proteínas de superfície e polissacarídeo capsular. Os sorotipos 1a, 1b, II e V estão relacionados à sepse neonatal precoce e o sorotipo III é o mais comum na sepse tardia com meningite ⁽⁴³⁾. Em 1996, foi publicada a primeira recomendação de pesquisa de colonização materna e profilaxia intraparto para o EGB, depois atualizada, em 2002 e 2010 ^(44, 45, 46). Após a introdução desta prática, a incidência de sepse precoce por esse agente diminuiu de 1,8 para 0,24 casos/1.000 nv nos Estados Unidos da América, porém esta bactéria

permanece responsável por 10% a 40% dos casos de sepse na primeira semana de vida ^(46, 47). Por outro lado, houve redução da taxa de mortalidade associada a esse micro-organismo, de 50%, na década de 1970, para 8%, atualmente ⁽⁴⁸⁾.

As bactérias gram-negativas apresentam como componente de sua membrana o lipopolissacarídeo (LPS); este é responsável por desencadear a resposta inflamatória, constituindo um importante fator de virulência nas infecções causadas por bactérias gram-negativas. É formado por um domínio hidrofóbico denominado lipídeo A, um núcleo de oligossacarídeo e um polissacarídeo distal chamado antígeno-O ⁽⁴⁹⁾.

A *Klebsiella* sp é uma bactéria gram-negativa, encapsulada, da família *Enterobacteriaceae*. Os reservatórios para sua transmissão são o trato gastrointestinal e as mãos dos profissionais de saúde. Esta bactéria representa um patógeno de grande importância na sepse neonatal. Dentre as quatro espécies descritas, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena* e *Klebsiella planticola*, a *Klebsiella pneumoniae* é a mais, frequentemente, observada em infecções neonatais graves ⁽⁴⁸⁾, podendo causar sepse precoce ou tardia. Mai et al. ⁽⁵⁰⁾, em 42 neonatos com sepse por *Klebsiella pneumoniae*, observaram quadro clínico inespecífico, incluindo febre, hipotermia, taquipneia, apneia, intolerância alimentar e, em 95% dos casos, aumento da proteína C reativa. A mortalidade foi 21%, com maior ocorrência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase nos pacientes com sepse tardia.

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa da família *Pseudomonadaceae*, relacionada à água e ao ambiente hospitalar e está associada à sepse neonatal tardia com mortalidade elevada ⁽⁴⁸⁾. Em uma coorte de 536 recém-nascidos, foram observados 825 episódios de sepse. A maioria dos casos com evolução fulminante teve como agente etiológico bactérias gram-negativas como *Pseudomonas* sp (42%), *Escherichia coli* (10%), *Klebsiella* sp (8%) e *Enterobacter* sp (8%). A frequência de sepse fulminante foi elevada na infecção por *Pseudomonas* sp, quando 56% dos recém-nascidos faleceram nas primeiras 48 horas após o isolamento do agente em hemocultura ⁽⁵¹⁾.

Justificativa

O *Streptococcus* B e as bactérias gram-negativas são os principais agentes de infecção invasiva neonatal, com elevada mortalidade, sendo o colostro um reconhecido fator de proteção anti-infecciosa. A gemelaridade constitui fator de risco para o nascimento prematuro e maior vulnerabilidade à infecção. Até o momento, não há estudos na literatura examinando a concentração de anticorpos da classe IgA totais e reativos com *Streptococcus* B e com os lipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* e de *Pseudomonas aeruginosa* no colostro, as concentrações de IgG séricas destes anticorpos e a ocorrência de infecção neonatal em recém-nascidos gemelares.

Hipótese

O presente estudo baseia-se na hipótese de que as concentrações de anticorpos IgG anti-*Streptococcus B* e anticorpos anti-LPS de bactérias gram-negativas no sangue do cordão umbilical e a concentração de anticorpos IgA totais e específicos anti-*Streptococcus B* e anti-LPS de bactérias gram-negativas no colostro de mães de recém-nascidos gemelares possam estar relacionados a episódios de infecção neonatal durante a internação hospitalar.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Descrever as concentrações de anticorpos IgG totais e específicos para *Streptococcus* do grupo B, e para os lipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* e de *Pseudomonas aeruginosa* presentes no cordão umbilical de recém-nascidos gemelares.
- Descrever as concentrações de anticorpos IgA totais e específicos para *Streptococcus* do grupo B, e para os lipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* e de *Pseudomonas aeruginosa* presentes no colostro das mães de recém-nascidos gemelares.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a possível associação entre episódios de infecção neonatal e as concentrações de anticorpos IgG e IgA totais e específicos para *Streptococcus* do grupo B, e para os lipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* e de *Pseudomonas aeruginosa* no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos gemelares e no colostro de suas mães.
- Analisar a concentração de anticorpos IgG e IgA totais e específicos para *Streptococcus* do grupo B, e para os lipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* e de *Pseudomonas aeruginosa* no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos gemelares e no colostro de suas mães de acordo com a idade gestacional.

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Aprovação em Comissão de Ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e faz parte do Projeto CAPPesq n° 0500/11: Transferência transplacentária de anticorpos em gestações múltiplas. Recebeu auxílio da Fundação de auxílio FAPESP (Anexo A).

3.2 Casuística

Modelo do estudo

Foi conduzido um estudo prospectivo transversal de uma coorte de recém-nascidos gemelares internados no Centro Neonatal do ICR-HCFMUSP no período de 20 meses.

Critérios de inclusão

Todos os recém-nascidos gemelares nascidos no período entre 01/05/2012 e 31/12/2013 foram incluídos.

Critérios de exclusão

Os recém-nascidos que apresentaram alguma das seguintes condições foram excluídos:

- malformação ou síndrome genética;

- perfil sorológico materno positivo para HIV, CMV, hepatites B e C, lues, toxoplasmose e rubéola, durante o pré-natal;
- rotura de membranas ovulares com período superior a 12 horas;
- presença de corioamnionite;
- presença de imunodeficiência; e
- amostra de sangue ou colostro inadequada ou insuficiente.

Variáveis analisadas

Para cada neonato foi preenchido um formulário com dados clínicos e resultados dos exames laboratoriais para criação do banco de dados. As seguintes variáveis foram analisadas:

- Idade gestacional: determinada pela data da última menstruação e confirmada pela ultrassonografia obstétrica realizada no primeiro trimestre. Os métodos de Capurro ⁽⁵²⁾ para recém-nascidos de termo e New Ballard ⁽⁵³⁾ para recém-nascidos prematuros foram utilizados para avaliação da idade gestacional em casos de dúvida sobre a DUM e ausência de exame ultrassonográfico no primeiro trimestre;
- Colonização materna para *Streptococcus* do grupo B;
- Peso de nascimento: aferido em balança digital de precisão (com aproximação de 5 gramas);
- Gênero masculino e feminino;
- Classificação gestacional: utilizada a curva de Alexander ⁽⁵⁴⁾;

- Concentrações de anticorpos IgG totais e específicos anti-*Streptococcus B* e antilipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* e de *Pseudomonas aeruginosa* no sangue de cordão umbilical de cada gemelar;
- Concentrações de anticorpos IgA totais e específicos anti-*Streptococcus B* e antilipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* e de *Pseudomonas aeruginosa* no colostro das mães destes gemelares;
- Nutrição enteral (se recebeu colostro nas primeiras 72 horas de vida);
- Episódios de infecção: o diagnóstico de sepse foi estabelecido conforme os seguintes critérios^(55, 56):
 - Sepse: presença de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) associada à infecção comprovada;
 - SIRS: presença de instabilidade térmica (febre ou hipotermia) ou alteração na contagem de leucócitos: leucocitose ($> 34.000 \times 10^9/L$), leucopenia ($< 5.000 \times 10^9/L$), $> 10\%$ neutrófilos imaturos ou índice neutrofílico $> 0,2$; plaquetopenia ($< 100.000 \times 10^9/L$); PCR > 10 mg/dL associado a, pelo menos, um dos seguintes critérios: letargia, intolerância alimentar, taquicardia (FC > 180 bpm), bradicardia (FC ≤ 100 bpm); taquipneia (FR > 60 rpm) ou ventilação mecânica para um processo agudo não relacionado à doença neuromuscular de base nem ao uso de anestesia;

- Sepses bacteriana: diagnóstico clínico e/ou laboratorial de sepsis com identificação de bactéria em hemocultura;
 - Infecção focal: infecção limitada a um determinado órgão com cultura positiva ⁽⁴⁷⁾; e
- Desfecho: alta ou óbito.

3.3 Métodos

Coleta das amostras

As coletas das amostras de sangue do cordão umbilical e colostro foram realizadas após o consentimento livre e esclarecido, assinado pelos pais.

A coleta de sangue do cordão umbilical foi realizada após o nascimento, por meio de um segundo pinçamento no cordão de cada gemelar conectado à placenta, para obtenção do segmento do qual foi colhido o sangue. Foram obtidos 5 a 10 ml de sangue e colocados em tubo contendo gel separador (BD Vacutainer SST®). O material foi encaminhado ao Laboratório de Investigação Médica (LIM-36) do Departamento de Pediatria da FMUSP.

As amostras de colostro foram colhidas até 72 horas após o parto, no volume de 5 mL e logo após transportadas em gelo para o LIM-36.

Dois *Pools* controle nos testes realizados foram utilizados: um *Pool* de soro humano controle, constituído por dez amostras de soro de adultos doadores de sangue saudáveis, dos sexos masculino e feminino e com

resultados negativos para testes sorológicos convencionais, e um *Pool* de colostro humano controle, constituído por 32 amostras de colostro de puérperas clinicamente saudáveis, ambos já disponíveis no LIM-36.

Processamento das amostras

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos a 4°C, e os soros divididos em alíquotas e condicionados à temperatura de - 80°C.

As amostras de colostro foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C para delipidação. A parte lipídica e o *pellet* contendo as células foram descartados e o sobrenadante dividido em alíquotas e armazenado à temperatura de - 80°C.

Dosagem de anticorpos da classe IgG total no soro

Os níveis séricos de anticorpos da classe IgG total foram avaliados pelo método de nefelometria, utilizando um nefelômetro (Behringer, EUA®) com padrões e controles apropriados. As dosagens de imunoglobulinas e diluição do soro das amostras foram realizadas, de acordo com o protocolo de ensaio para nefelômetro Behringer®.

Dosagem de anticorpos da classe IgA total no colostro

A avaliação dos anticorpos da classe IgA total do colostro foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme método descrito por Quinello et al. ⁽⁵⁷⁾. Microplacas de 96 orifícios (3590, Costar, NY, USA) foram

revestidas com anti-IgA humana (I-0884, Sigma, MO, USA) diluída em PBS pH 7,4 (concentração final de 5 µg/mL) e incubadas em câmara úmida por 16 a 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes com solução PBS Tween-20 a 0,1% (PBS-T). As amostras foram diluídas em tampão PBS NaCl 0,35M Tween-20 a 0,2% e adicionadas às placas em duplicatas e em quatro diluições seriadas, onde permaneceram incubadas por 2 horas a 37°C.

Em todos os ensaios, juntamente com as amostras, utilizou-se um padrão constituído de IgA de colostro (I-2636, Sigma, MO, USA) em concentrações variando entre 3,9 ng/mL a 250 ng/mL e o pool de colostro humano controle. Após as lavagens e posterior incubação do conjugado anti-IgA humano marcado com peroxidase (A-0295, α-chain specific, Sigma, MO, USA) por 90 minutos a 37°C e novas lavagens, foi adicionada a solução de substrato contendo 0,4 mg/mL de ortofenilenodiamina (P-8287, Sigma, MO, USA) em solução de citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e água oxigenada (H₂O₂) 0,01%. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2,5N e a leitura realizada em comprimento de onda 492 nm (Labsystems, Finland). Utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.0 (USA) para calcular os valores de cada teste. As concentrações de anticorpos da classe IgA total das amostras de colostro foram determinadas a partir dos valores da curva padrão de IgA de colostro e expressas em g/L.

Antígenos utilizados nos testes de ELISA

A cepa de *Streptococcus sp* do grupo B tipo III número H36C, lote 05/85 (ref. ATCC 12403) foi utilizada.

Os lipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* (L-4268, Sigma, USA), provenientes do ATCC, cepa 15380 e de *Pseudomonas aeruginosa* sorotipo 10, ATCC, cepa 27316 (L-9143, Sigma, USA), foram utilizados, ambos isolados de pacientes com infecção hospitalar.

Análise dos anticorpos das classes IgG e IgA anti-*Streptococcus B* por ELISA

Os anticorpos da classe IgG de soro do cordão umbilical e os anticorpos da classe IgA do colostro reativos com os antígenos de superfície do *Streptococcus* do grupo B foram avaliados por ELISA. Após repique do estoque de *Streptococcus* do grupo B em meio *Brain Heart Infusion* (BHI), foi realizado cultivo por 16 a 18 horas a 37°C. Após o crescimento bacteriano, foi realizada a inativação das bactérias em banho-maria, 60°C por 1 hora. Em seguida, aguardou-se o resfriamento por 30 minutos e centrifugou-se a 3.000 rpm em temperatura ambiente. O meio BHI foi desprezado, e o precipitado contendo as bactérias foi ressuspensão em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0 e ajustado para uma densidade óptica (DO) padronizada de 0,8 em espectrofotômetro Micronal em filtro de 540 nm. Placas de microtitulação (3590, Corning, NY, USA) foram adsorvidas com a suspensão bacteriana por 16 a 18 horas a 37°C. Cada etapa do teste foi precedida por quatro lavagens com solução salina tamponada com fosfato pH 7,4

acrescida de Tween 20 a 0,1% (PBS-T). As placas foram então bloqueadas (PBS 7,4 – leite desnatado em pó 1%) por 1 hora à temperatura ambiente e, em seguida, os *Pools* de soro e colostro humano controle e as amostras teste de soro dos recém-nascidos e colostro materno foram adicionados às placas em quatro diluições seriadas e em duplicata diluídos em tampão PBS NaCl 0,35M - Tween-20 0,1% - leite desnatado em pó 1%, permanecendo por 2 horas a 37°C. Em seguida, as placas foram incubadas com os conjugados anti-IgG ou anti-IgA humanos marcados com peroxidase (A-0170 ou A-0295, Sigma, MO, USA) por 2 horas a 37°C e a solução de substrato contendo 0,4 mg/mL de ortofenilenodiamina (P-8287, Sigma, MO, USA) em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e H₂O₂ 0,01% foi adicionada. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2,5N e a leitura realizada em comprimento de onda 492 nm (Labsystems, Finland). O programa GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para montar curvas semilog a partir das densidades ópticas obtidas por meio da leitura das placas.

Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA/mL), obtidos por interpolação na curva padrão montada com os resultados das densidades ópticas dos *Pools* de colostro e soro humano controle, que foram definidos, como contendo 1.000 UA/mL de anticorpos da classe IgA ou IgG, respectivamente, reativos com *Streptococcus* do grupo B.

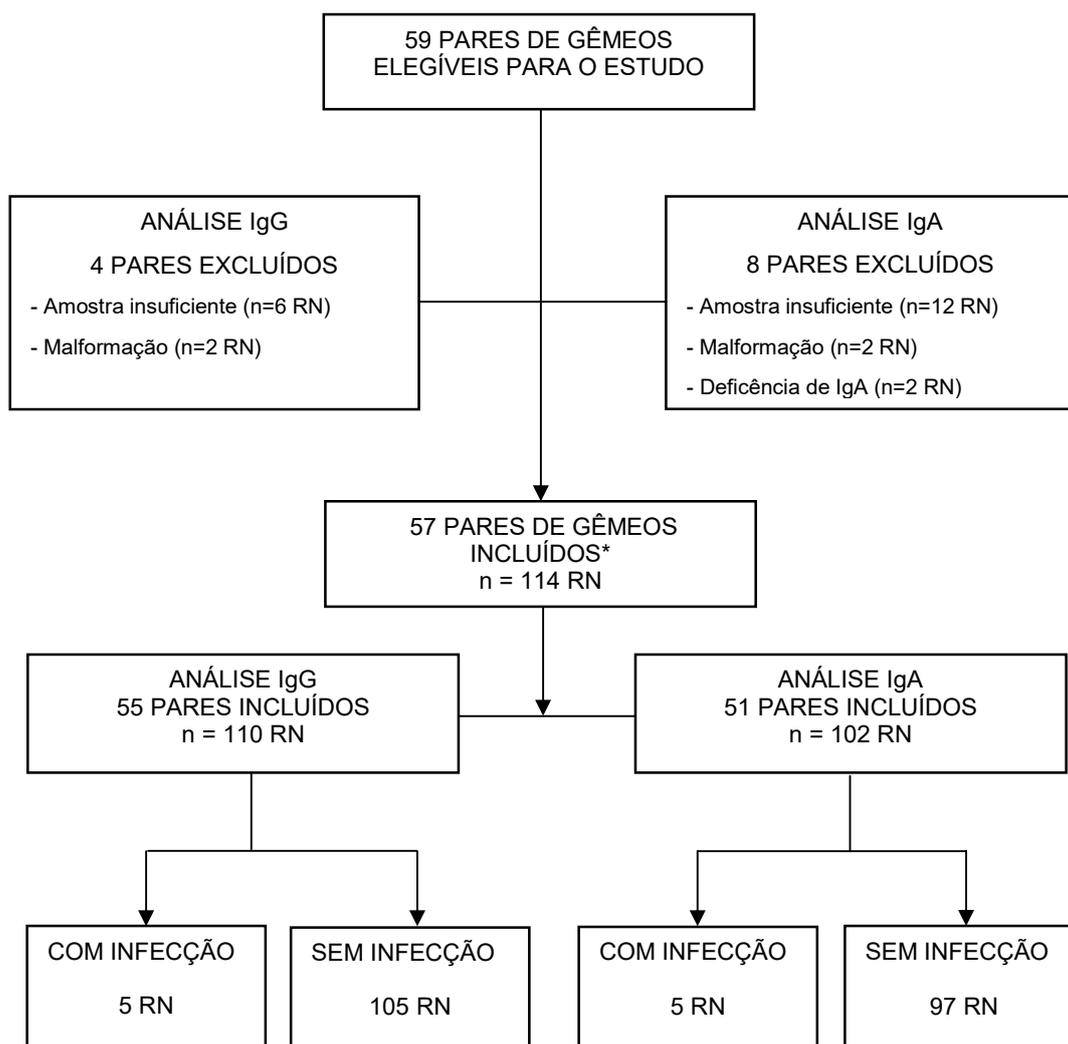
Análise dos anticorpos das classes IgG e IgA anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* por ELISA

Os testes foram realizados utilizando-se microplacas de 96 poços (Costar, USA) adsorvidas com 10 µg/mL de LPS de *Klebsiella pneumoniae* ou de *Pseudomonas aeruginosa* diluídos em PBS pH 7,4. Após incubação por 16 a 18 horas a 4°C, as placas foram lavadas com PBS-T. A seguir, os *pools* de soro e colostro humano controle e as amostras teste de soro dos RN e colostro materno foram adicionados em quatro diluições seriadas em PBS-NaCl 0,5 M Tween 0,2% e em duplicata, permanecendo incubadas por 2 horas a 37°C. Depois de novas lavagens, as placas foram incubadas com conjugado anti-IgG ou anti-IgA humano marcados com peroxidase (A-0170 ou A-0295, Sigma, MO, USA) por 2 horas a 37°C e a solução de substrato contendo 0,4 mg/mL de ortofenilenodiamina (P-8287, Sigma, MO, USA) em tampão citrato-fostafato 0,1M, pH 5,0 e H₂O₂ 0,01% foi adicionada. Após 30 minutos de incubação ao abrigo da luz, a reação enzimática foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2,5N. A absorvância foi mensurada em leitor para microplacas no comprimento de onda 492 nm (Labsystems, Finland). O programa GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para montar curvas semilog a partir das densidades ópticas obtidas por meio da leitura das placas.

Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA/mL), obtidos por interpolação na curva padrão montada com os resultados das densidades ópticas dos *Pools* de colostro e soro humano controle, que foram definidos como contendo 1.000 UA/mL de anticorpos da classe IgA ou IgG,

respectivamente, reativos com LPS de *Klebsiella pneumoniae* ou de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.4 Delineamento do Estudo



*2 pares excluídos para IgG foram incluídos para IgA

3.5 Análise Estatística

Para a descrição dos resultados, foram utilizadas as frequências relativas (percentuais) e absolutas (N) das classes de cada variável qualitativa.

Para as variáveis quantitativas, foram utilizados a média, a mediana, o valor mínimo, o valor máximo e o desvio-padrão para indicar a variabilidade dos dados.

A comparação entre o peso de nascimento e a concentração dos anticorpos no sangue do cordão umbilical foi realizada por meio do teste t-Student pareado ou teste de Wilcoxon pareado ⁽⁵⁸⁾.

Os anticorpos maternos no colostro foram descritos e comparados, conforme a presença de infecção em algum dos recém-nascidos gemelares com o uso de teste t-Student para os anticorpos, e o teste de Mann-Whitney para os demais anticorpos ⁽⁵⁹⁾.

Para a avaliação dos anticorpos neonatais, conforme a presença de infecção e a idade gestacional, foram descritas as concentrações de IgG total e IgA total, de acordo com as categorias de interesse e comparados os valores dos anticorpos entre as categorias com uso de equações de estimação generalizadas (EEG) com distribuição marginal normal. Os demais anticorpos com uso de equações de estimação generalizadas com distribuição marginal gama e função de ligação identidade, supondo matriz de correlações componentes simétricas entre os gemelares e com o uso de comparações múltiplas de Bonferroni ⁽⁵⁹⁾.

Os resultados foram ilustrados com uso de diagramas de dispersão. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%. Os softwares utilizados para as análises foram o SPSS e o MS Office Excel para Windows.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise Descritiva da Amostra

Entre maio de 2012 e dezembro de 2013, foram elegíveis para o estudo 59 pares de gêmeos, sendo excluídos quatro pares de gêmeos para análise de anticorpos IgG, três em razão da coleta de amostra insuficiente e um por malformação congênita (tetralogia de Fallot). Foram excluídas oito mães para análise de anticorpos IgA, seis pela amostra de colostro insuficiente, uma pela presença de malformação congênita no recém-nascido e uma por diagnóstico materno de deficiência de IgA. Foram incluídos 57 pares de gêmeos, compondo a casuística de 114 recém-nascidos.

A seguir, os resultados estão apresentados em 18 Tabelas e oito gráficos.

Os dados das Tabelas 1 e 2 mostram que o tipo de parto mais frequente foi cesáreo (86%). A idade materna foi $29,4 \pm 5,9$ anos (média \pm DP), a idade gestacional foi $36 \pm 1,65$ semanas (média \pm DP) e o peso de nascimento foi $2.304,8 \pm 460$ g (média \pm DP). A idade gestacional variou entre 29 e 38 semanas. A maioria dos recém-nascidos avaliados apresentava idade gestacional entre 34 e 36 6/7 semanas (50,9%), classificação adequada para a idade gestacional (80,7%) e peso de nascimento entre 1.500 e 2.499 g (57%). Houve discreto predomínio do gênero feminino (51,8%).

Tabela 1 - Caracterização demográfica de 57 mães e de 114 recém-nascidos gemelares

Variável	Descrição N	%
Colonização materna por <i>Streptococcus B</i>*		
Positiva	10	18,5
Negativa	44	81,5
Tipo de Parto		
Normal	16	14,0
Cesáreo	98	86,0
Peso de nascimento (gramas)		
> 2.500	41	36,0
1.500 – 2.499	65	57,0
1.000 – 1.499	7	6,1
< 1.000	1	0,9
Idade gestacional (semanas)		
≥ 37	46	40,4
34 – 36 6/7	58	50,9
32 – 33 6/7	8	7,0
28 – 31 6/7	2	1,7
<28	0	0,0
Classificação gestacional		
GIG	3	2,6
AIG	92	80,7
PIG	19	16,7
Gênero		
Masculino	55	48,2
Feminino	59	51,8

*3 casos sem informação

Tabela 2 - Estatística descritiva da idade gestacional, peso de nascimento e tempo de internação de 114 recém-nascidos gemelares

Variável	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
Idade Gestacional (semanas)	36,0	36,3	29,7	38,3	1,7
Peso de nascimento (gramas)	2.304,8	2.328,0	1.150,0	3.600,0	460,0
Tempo de internação (dias)	8,8	3,0	2	76	11,5

4.2 Concentração de anticorpos séricos IgG totais e específicos anti-*Streptococcus B*, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*

Nos dados da Tabela 3 são observadas as concentrações em que houve detecção de anticorpos séricos IgG totais e específicos anti-*Streptococcus B*, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* em todas as amostras colhidas do cordão umbilical de recém-nascidos.

Tabela 3 - Estatística descritiva das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos anti-*Streptococcus B*, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* no cordão umbilical de recém-nascidos gemelares

Variável	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
IgG total (mg/dL)	835,71	828,00	273,00	1.352,00	190,73
IgG anti- <i>Streptococcus B</i> (UA/mL)	295,10	199,25	34,60	1.313,80	250,66
IgG anti- <i>Klebsiella pneumoniae</i> (UA/mL)	504,75	185,60	13,10	6.205,40	933,93
IgG anti- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UA/mL)	280,04	99,90	13,30	3.567,80	498,66

Nos dados da Tabela 4, pode ser observado que a concentração de IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* foi significativamente menor no segundo gemelar. Com relação ao peso de nascimento e à concentração de anticorpos séricos IgG totais e específicos anti-*Streptococcus* B e anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*, não houve diferença estatística entre primeiro e o segundo gemelar.

Tabela 4 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos de recém-nascidos gemelares, conforme peso e ordem de nascimento

Variável	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	N	p
Peso							
1º gemelar (g)	2.353,7	2.342	1.190	3.220	431,9	55	
2º gemelar (g)	2.255,8	2.300	1.150	3.600	485,5	55	0,082*
IgG total							
1º gemelar (mg/dL)	845,1	850	273	1.188	184,9	55	
2º gemelar (mg/dL)	826,3	811	273	1.352	197,6	55	0,407*
IgG anti-<i>Streptococcus</i> B							
1º gemelar (UA/mL)	298,2	202,2	56,3	1.313,8	257,9	55	
2º gemelar (UA/mL)	292	197,7	34,6	1.229,8	245,5	55	0,716
IgG anti-<i>K.pneumoniae</i>¹							
1º gemelar (UA/mL)	522,6	184,8	13,1	5.404,4	937,8	55	
2º gemelar (UA/mL)	486,9	186,4	23,9	6.205,4	938,3	55	0,846
IgG anti-<i>P.aeruginosa</i>²							
1º gemelar (UA/mL)	289,7	103,2	13,3	3.567,8	560,9	55	
2º gemelar (UA/mL)	270,3	98,8	20,9	2.192,7	432,6	55	0,031

Resultado do teste Wilcoxon pareado; * Resultado do teste t-Student pareado;
 1. *Klebsiella pneumoniae*; 2. *Pseudomonas aeruginosa*;

Os dados expressos na Tabela 5 mostram que não foi encontrada diferença significativa de concentração dos anticorpos séricos IgG totais, e específicos anti-*Streptococcus B*, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, de acordo com o gênero.

Tabela 5 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos de recém-nascidos gemelares, conforme o gênero

Variável	Gênero	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	N	p
IgG total (mg/dL)	Fem	842,9	828	273	1.154	172,4	59	0,187*
	Masc	827,4	814	273	1.352	211,5	51	
IgG anti-EGB ¹ (UA/mL)	Fem	286,9	207,4	34,6	1.155	239,4	59	0,373
	Masc	304,6	189,1	53,4	1.313,8	265,1	51	
IgG anti- <i>K.pneumoniae</i> ² (UA/mL)	Fem	452,5	186,4	26,7	3.463,2	680,4	59	0,113
	Masc	565,2	170,6	13,1	6.205,4	1.165,1	51	
IgG anti- <i>P.aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	Fem	346,9	99,2	25,9	3.567,8	638	59	0,112
	Masc	202,7	100,6	13,3	1.034,8	241,9	51	

EEG com distribuição gama; * EEG com distribuição normal;

1. *Streptococcus B*; 2. *Klebsiella pneumoniae*; 3. *Pseudomonas aeruginosa*;

Os dados das Tabelas 6 e 7 demonstram que houve menor concentração de anticorpos séricos IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* nos recém-nascidos classificados como pequenos para a idade gestacional em relação aos recém-nascidos classificados como adequados para a idade gestacional. Para os anticorpos séricos IgG totais, anti-*Streptococcus* B e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* não foi encontrada diferença, conforme a classificação gestacional.

Tabela 6 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos de recém-nascidos gemelares, conforme a classificação gestacional

Variável	Classificação	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	N	p
IgG total (mg/dL)	PIG	805,7	765,5	562,0	1.160,0	175,6	18	0,141*
	AIG	841,7	840,0	273,0	1.352,0	197,0	89	
	GIG	839,0	828,0	792,0	897,0	53,4	3	
IgG anti-EGB ¹ (UA/mL)	PIG	292,2	186,4	72,9	1.131,9	271,6	18	0,099
	AIG	301,5	206,3	34,6	1.313,8	250,0	89	
	GIG	122,0	113,6	104,5	148,0	22,9	3	
IgG anti- <i>K.pneumoniae</i> ² (UA/mL)	PIG	452,2	124,8	13,1	2.596,9	711,1	18	0,015
	AIG	524,1	221,4	23,9	6.205,4	989,4	89	
	GIG	245,7	219,7	104,6	412,9	155,8	3	
IgG anti- <i>P.aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	PIG	165,8	111,6	13,3	457,5	152,6	18	0,552
	AIG	308,6	99,2	20,2	3.567,8	546,6	89	
	GIG	117,8	70,8	34,1	248,4	114,6	3	

EEG com distribuição gama; * EEG com distribuição normal;

1. *Streptococcus* B; 2. *Klebsiella pneumoniae*; 3. *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 7 - Comparação das concentrações de anticorpos séricos IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* de recém-nascidos gemelares, conforme a classificação gestacional

Variável	Comparação*	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
IgG anti-K. <i>pneumoniae</i> ¹	PIG - AIG	-116,49	40,74	0,013	-214,03	-18,95
	PIG - GIG	-221,73	115,11	0,162	-497,31	53,85
	AIG - GIG	-105,24	100,54	0,886	-345,93	135,45

Comparações múltiplas de Bonferroni;

1. *Klebsiella pneumoniae*

A concentração média de anticorpos séricos IgG totais foi significativamente menor nos recém-nascidos prematuros ($p < 0,001$). Para os anticorpos séricos IgG anti-*Streptococcus* B, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, não foram observadas diferenças entre os grupos. Estes achados estão apresentados nos dados da Tabela 8.

Tabela 8 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos de recém-nascidos gemelares de termo e prematuros

Variável	Idade Gestacional (semanas)	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	N	p
IgG total (mg/dL)	≥37	960,5	966	538	1.352	170,6	44	<0,001*
	<37	752,5	766,5	273	1.037	155,5	66	
IgG anti-EGB ¹ (UA/mL)	≥37	320,0	206,8	53,1	1.229,8	271,3	44	0,556
	<37	278,5	192,4	34,6	1.313,8	236,6	66	
IgG anti- <i>K. pneumoniae</i> ² (UA/mL)	≥37	816,0	367,1	35,6	6.205,4	1337,5	44	0,053
	<37	297,3	171,1	13,1	2.515,2	412,2	66	
IgG anti- <i>P. aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	≥37	377,7	210	21,9	3.567,8	632,1	44	0,281
	<37	214,9	89,1	13,3	1.942,4	376,8	66	

Resultado do teste Mann-Whitney; *Resultado do teste t-Student;

1. *Streptococcus* B; 2. *Klebsiella pneumoniae*; 3. *Pseudomonas aeruginosa*

Os dados da Tabela 9 mostram que a concentração média de anticorpos séricos IgG totais ($p=0,013$) e IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* ($p=0,032$) foi significativamente menor nos recém-nascidos com idade gestacional inferior a 34 semanas. Para os anticorpos séricos da classe IgG anti-EGB e anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*, não foi observada diferença entre os grupos.

Tabela 9 - Estatística descritiva das concentrações de anticorpos séricos IgG totais e específicos de recém-nascidos gemelares e comparação a partir da idade gestacional de 34 semanas

Variável	Idade Gestacional (semanas)	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	N	P
IgG total (mg/dL)	≥34	851,1	842,5	273	1.352	181,6	102	0,013*
	<34	639,4	712,0	273	847	207,6	8	
IgG anti-EGB ¹ (UA/mL)	≥34	296,0	199,3	34,6	1.313,8	256,6	102	0,918
	<34	283,2	214,9	108,3	514,1	168,1	8	
IgG anti- <i>K.pneumoniae</i> ² (UA/mL)	≥34	527,3	213,5	13,1	6.205,4	963,1	102	0,183
	<34	216,9	100,4	26,7	956,9	309,4	8	
IgG anti- <i>P.aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	≥34	295,3	103,8	13,3	3.567,8	514,8	102	0,032
	<34	85,1	87,8	47,1	119,3	27	8	

Resultado do teste Mann-Whitney; *Resultado do teste t-Student;

1. *Streptococcus B*; 2. *Klebsiella pneumoniae*; 3. *Pseudomonas aeruginosa*

As concentrações dos anticorpos séricos IgG totais e específicos, de acordo com a idade gestacional estão demonstradas nos Gráficos de 1 a 4.

Gráfico 1 - Concentrações de anticorpos séricos IgG totais de recém-nascidos gemelares, conforme a idade gestacional

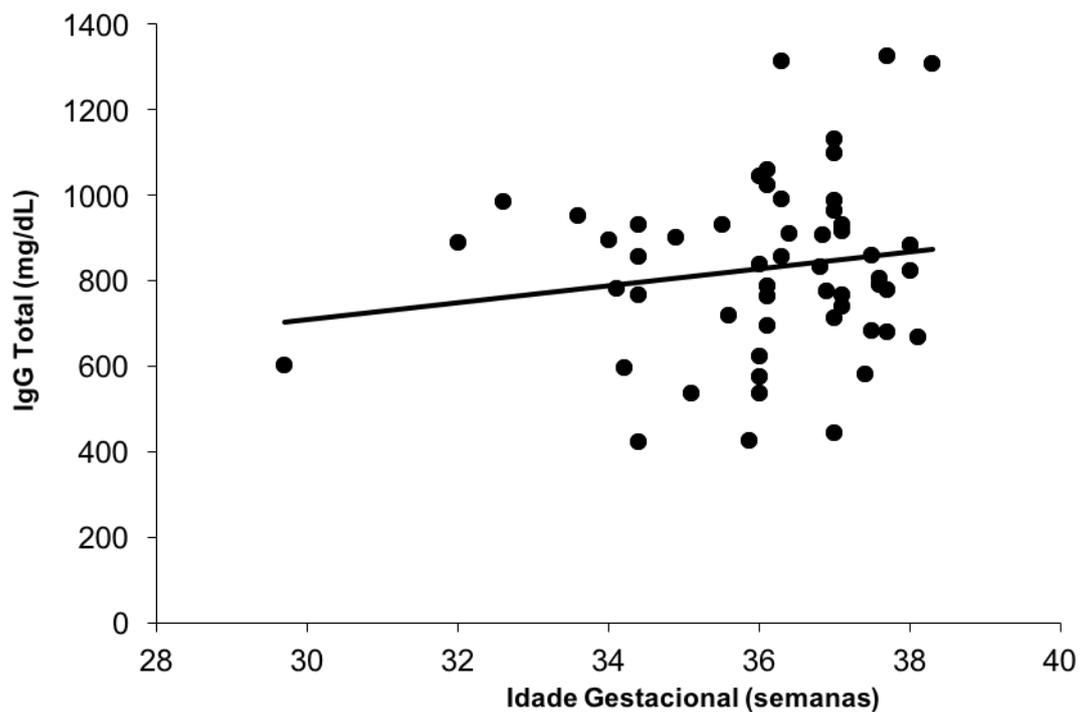


Gráfico 2 - Concentrações de anticorpos séricos IgG anti-*Streptococcus B* de recém-nascidos gemelares, conforme a idade gestacional

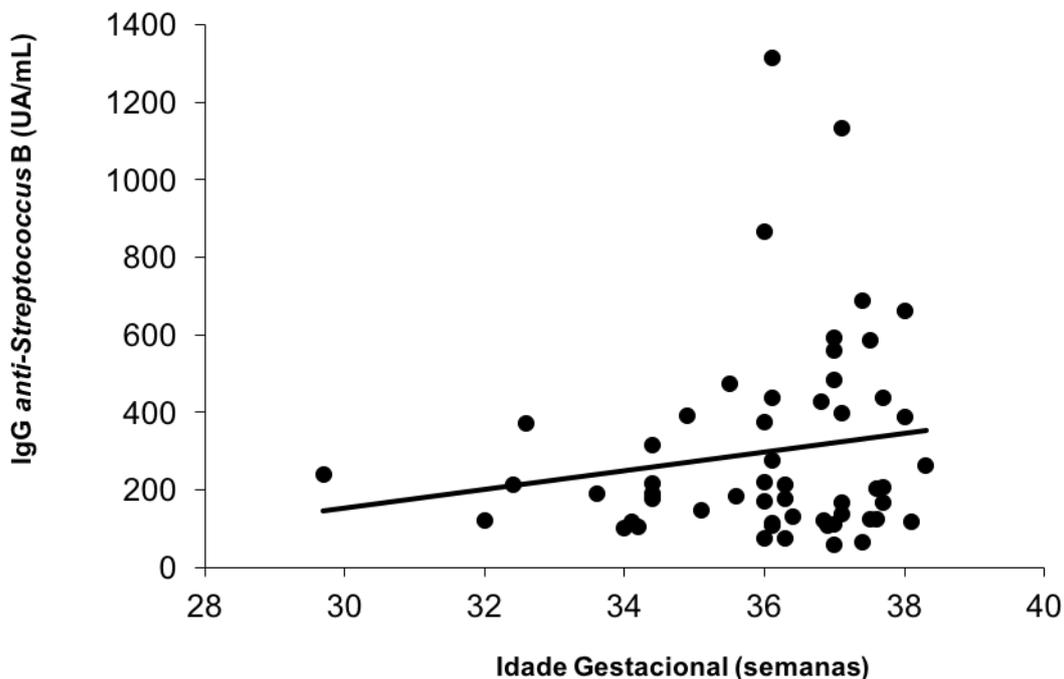
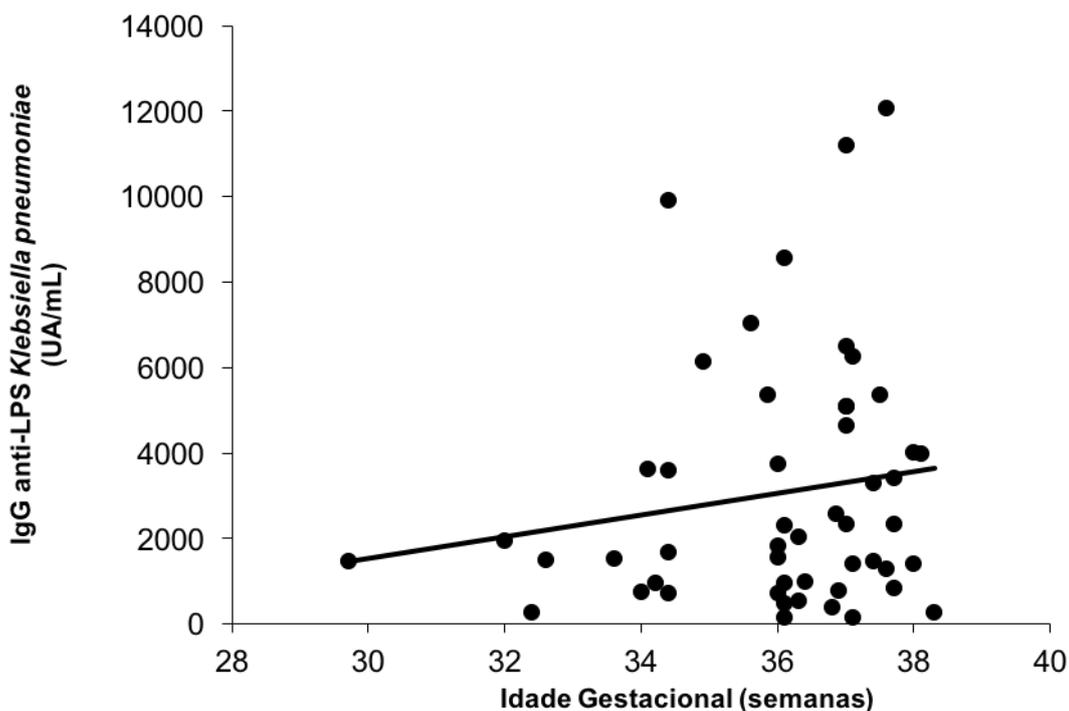


Gráfico 3 - Concentrações de anticorpos séricos IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* de recém-nascidos gemelares, conforme a idade gestacional



4.3 Concentrações de anticorpos IgA totais e específicos no colostro

Foram analisadas 52 amostras de colostro. Houve detecção de anticorpos IgA totais e específicos anti-*Streptococcus* B, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* no colostro de 51 mães (98,1%). Os dados estão apresentados na Tabela 10. Em uma amostra de colostro (1,9%), as concentrações dos anticorpos IgA totais e específicos foram indetectáveis. Essa paciente foi diagnosticada como deficiente de IgA e foi excluída da análise dos anticorpos da classe IgA.

Tabela 10 - Estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgA totais e específicos no colostro de 51 mães de gemelares

Variável	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
IgA total (g/L)	210,2	106,7	6,4	1099,3	285,3
IgA anti- <i>Streptococcus</i> B (UA/mL)	6640,8	1910,4	47,6	43052,5	9526,8
IgA anti- <i>Klebsiella pneumoniae</i> (UA/mL)	3070,1	1944,4	147,1	12069,6	2886,6
IgA anti- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UA/mL)	3231,0	2372,0	122,7	11594,4	2935,2

Os dados da Tabela 11 demonstram que a concentração de anticorpos maternos IgA totais e reativos com *Streptococcus B* não sofreu influência da colonização vaginal materna por essa bactéria.

Tabela 11 - Estatística descritiva das concentrações de anticorpos maternos IgA totais e reativos com *Streptococcus B*, de acordo com colonização vaginal para *Streptococcus B*

Variável	Colonização EGB	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	N	p
IgA total (g/L)	Negativa	248,8	152,6	6,4	1.099,3	317,3	38	0,263
	Positiva	111,6	79	15,3	364,1	111,6	10	
IgA anti-EGB ¹ (UA/mL)	Negativa	6.910,8	2.184,6	47,6	3.5118,4	8.806,7	38	0,698
	Positiva	7.326,4	1.792,0	118	4.3052,5	1.3172,1	10	

Resultado do teste Mann-Whitney;

1. *Streptococcus B*

Os dados da Tabela 12 mostram que a concentração média de anticorpos IgA anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* foi significativamente menor no colostro de mães de recém-nascidos prematuros ($p=0,013$). Para os anticorpos IgA totais e específicos anti-*Streptococcus* B e anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*, não foram observadas diferenças entre os grupos a termo e prematuros.

Tabela 12 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos IgA totais e específicos no colostro das mães de recém-nascidos gemelares de termo e prematuros

Variável	IG (sem)	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	N	p
IgA total (g/L)	≥37	288,8	78,2	6,4	1.099,3	363,7	21	0,702
	<37	155,1	126,5	9,0	1.060,4	203,7	30	
IgA anti-EGB ¹ (UA/mL)	≥37	6.761,2	1.827,7	47,6	43.052,5	10.238,4	21	0,759
	<37	6.556,5	2.183,4	190,8	35.118,4	9.174,7	30	
IgA anti- <i>K.pneumoniae</i> ² (UA/mL)	≥37	3.925,5	3.406,3	153,9	12.069,6	3.201,2	21	0,076*
	<37	2.471,4	1.547,0	147,1	9.903,2	2.529,5	30	
IgA anti- <i>P.aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	≥37	4.430,9	3.510,2	242,1	11.594,4	3.425,1	21	0,013*
	<37	2.391,2	1.589,4	122,7	7.597,2	2.234,2	30	

Resultado do teste Mann-Whitney; * Resultado do teste t-Student; IG (idade gestacional); sem (semanas);
 1. *Streptococcus* B; 2. *Klebsiella pneumoniae*; 3. *Pseudomonas aeruginosa*

A comparação das concentrações dos anticorpos da classe IgA presentes no colostro entre mães com parto antes ou após 34 semanas de idade gestacional encontrou concentrações significativamente menores de IgA anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* no colostro das mães com parto antes de 34 semanas de idade gestacional ($p=0,001$). Para os anticorpos IgA totais e específicos anti-*Streptococcus* B e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* não foram observadas diferenças entre os grupos. Estes dados estão apresentados na Tabela 13.

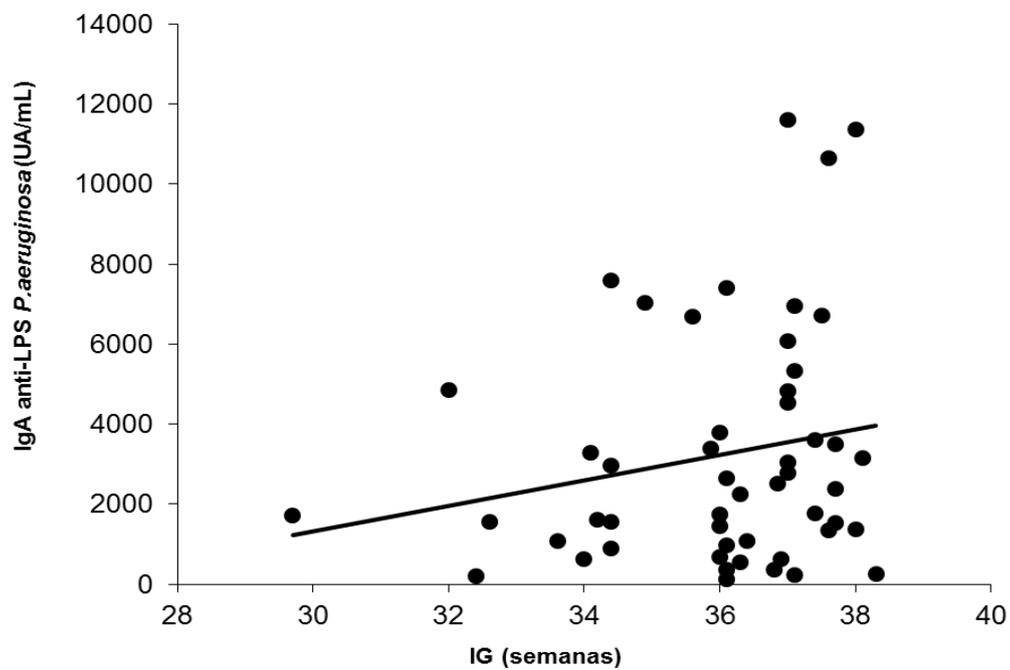
Tabela 13 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos IgA totais e específicos no colostro das mães, a partir da idade gestacional de 34 semanas de gestação

Variável	IG (sem)	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	N	P
IgA total (g/L)	≥34	209,9	95,7	6,4	1.099,3	294,4	46	0,395
	<34	213,0	154,1	54,2	572,7	206,8	5	
IgA anti-EGB ¹ (UA/mL)	≥34	6.797,3	1.917,2	47,6	43.052,5	9.870,1	46	0,842
	<34	5.201,3	1.141,2	778,2	13.202,3	5.971,1	5	
IgA anti- <i>K. pneumoniae</i> ² (UA/mL)	≥34	3.257,5	2.320,4	147,1	12.069,6	2.976,0	46	0,001*
	<34	1.346,5	1.499,3	264,8	1.944,4	633,9	5	
IgA anti- <i>P. aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	≥34	3.377,1	2.593,8	122,7	11.594,4	3.012,4	46	0,285*
	<34	1.887,0	1.563,6	194,3	4.851,5	1.761,4	5	

Resultado do teste Mann-Whitney; * Resultado do teste t-Student; IG (idade gestacional); sem (semanas);

1. *Streptococcus* B; 2. *Klebsiella pneumoniae*; 3. *Pseudomonas aeruginosa*

Gráfico 8 - Concentrações de anticorpos IgA anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* no colostro das mães, conforme a idade gestacional



4.4 Análise dos anticorpos no grupo de recém-nascidos com infecção

No estudo, foram diagnosticados cinco casos de sepse tardia com hemocultura positiva durante a internação hospitalar (4,3%). Os agentes etiológicos identificados em hemocultura foram: *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*. Quanto ao desfecho no grupo com sepse, quatro recém-nascidos receberam alta hospitalar e um faleceu. Este foi o único óbito observado na casuística estudada. Os casos de infecção com hemocultura positiva estão apresentados nos dados da Tabela 14.

Tabela 14 - Estatística descritiva das características de recém-nascidos gemelares com sepse tardia com hemocultura positiva e concentrações de anticorpos IgG séricos e IgA do colostro

Variável	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Idade Gestacional (semanas)	34,1	34,1	29,7	29,7	33,6
Peso de Nascimento (gramas)	1.270	1.270	1.510	1.160	1.190
Ordem de nascimento	2	2	1	2	1
Gênero	Fem	Masc	Masc	Masc	Fem
IgG total (mg/dL)	683	615	273	356	847
IgG anti-EGB ¹ (UA/mL)	183,7	122	239,4	438,7	190,3
IgG anti- <i>K.pneumoniae</i> ² (UA/mL)	329,3	305,9	113	170,6	87,8
IgG anti- <i>P.aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	107	23,1	64,3	89,7	56,6
IgA total (g/L)	173,6	50,8	54,2	54,2	572,7
IgA anti-EGB ¹ (UA/mL)	23.819,6	2.458,8	778,2	778,2	13.202,3
IgA anti- <i>K.pneumoniae</i> ² (UA/mL)	9.903,2	3.623,8	1.482,8	1.482,8	1.541,4
IgA anti- <i>P.aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	7.597,2	3.289,6	1.731,2	1.731,2	1.094,3
Dieta (ingestão de colostro)	Não	Não	Não	Não	Não
Hemocultura	S. <i>epidermidis</i> ⁴	K. <i>pneumoniae</i> ²	A. <i>baumanni</i> ³	S. <i>aureus</i> ⁵	S. <i>epidermidis</i> ⁴
Tempo de internação (dias)	31	30	76	12	50
Desfecho	Alta	Alta	Alta	Óbito	Alta

1. *Streptococcus B*; 2. *Klebsiella pneumoniae*; 3. *Pseudomonas aeruginosa*; 4. *Staphylococcus epidermidis*; 5. *Acinetobacter baumannii*; 6. *Staphylococcus aureus*; Fem (feminino); Masc (masculino)

Houve diagnóstico de infecção sem hemocultura positiva em dois recém-nascidos. Um apresentou sepse precoce presumida e, o outro, conjuntivite por *Pseudomonas aeruginosa*. Estes casos estão apresentados nos dados da Tabela 15.

Tabela 15 - Estatística descritiva das características de dois recém-nascidos gemelares com infecção e hemocultura negativa e concentrações de anticorpos IgG séricos e IgA do colostro

Variável	Caso 6	Caso 7
Idade Gestacional (semanas)	35,6	36,1
Peso de Nascimento (gramas)	2.710	1.946
Ordem de nascimento	2	2
Gênero	Masc	Fem
IgG total (mg/dL)	814	715
IgG anti-EGB ¹ (UA/mL)	178,3	204
IgG anti- <i>K.pneumoniae</i> ² (UA/mL)	593,4	171,6
IgG anti- <i>P.aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	68,4	1.870,4
IgA total (g/L)	31,5	222,9
IgA anti-EGB ¹ (UA/mL)	2.442,8	4.378,2
IgA anti- <i>K.pneumoniae</i> ² (UA/mL)	7.027,8	5.361,4
IgA anti- <i>P.aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	6.702,9	3.395,2
Dieta (ingestão de colostro)	Não	Sim
Diagnóstico	Sepse Precoce	Conjuntivite
Cultura	Hemocultura negativa	<i>P.aeruginosa</i> ³
Tempo de internação (dias)	18	15
Desfecho	Alta	Alta

1. *Streptococcus B*; 2. *Klebsiella pneumoniae*; 3. *Pseudomonas aeruginosa*; Fem (feminino); Masc (masculino)

Para análise estatística da influência das concentrações de anticorpos séricos e do colostro na incidência de infecção, foram considerados apenas os casos de sepse com hemocultura positiva (n=5).

Conforme pode ser observado nos dados da Tabela 16, não foi encontrada diferença significativa entre as concentrações de IgA totais e específicas presentes no colostro das mães dos recém-nascidos com e sem infecção.

Tabela 16 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de IgA totais e específicas no colostro, conforme a presença de sepse neonatal em alguns dos recém-nascidos

Variável	Sepse	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	N	p
IgA total (g/L)	Não	212,3	107,5	6,4	1.099,3	293,5	46	0,724
	Sim	191	103,8	50,8	575,7	219,1	5	
IgA anti- EGB ¹ (UA/mL)	Não	6.462,6	1.882,4	47,6	43.052,5	9.564,1	46	0,431
	Sim	8.280	2.458,8	778,2	23.819,6	10.085,1	5	
IgA anti- <i>K.pneumoniae</i> ² (UA/mL)	Não	3.038,3	1.991,4	147,1	12.069,6	2.816,1	46	0,814*
	Sim	3.363,2	1.541,4	264,8	9.903,2	3.850,1	5	
IgA anti- <i>P.aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	Não	3.279,9	2.448,8	122,7	11.594,4	2.964,9	46	0,722*
	Sim	2.781,3	1.731,2	194,3	7.597,2	2.919,4	5	

Resultado do teste Mann-Whitney; * Resultado do teste t-Student;

1. *Streptococcus B*; 2. *Klebsiella pneumoniae*; 3. *Pseudomonas aeruginosa*

Os dados da Tabela 17 mostram que a concentração de anticorpos IgG totais foi significativamente menor nos recém-nascidos que apresentaram sepse quando comparados àqueles sem sepse ($p=0,049$). Para os anticorpos IgG específicos, não foi observada diferença significativa entre os recém-nascidos com e sem sepse neonatal.

Tabela 17 - Estatística descritiva e comparação das concentrações de anticorpos dos recém-nascidos, conforme a presença de sepse

Variável	Sepse	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	N	p
IgG total (mg/dL)	Não	849,1	831	273	1.352	178,9	105	0,049*
	Sim	554,8	615	273	847	236,8	5	
IgG anti-EGB ¹ (UA/mL)	Não	298,0	200,8	34,6	1.313,8	255,1	105	0,654
	Sim	234,8	190,3	122	438,7	121,4	5	
IgG anti- <i>K.pneumoniae</i> ² (UA/mL)	Não	519,2	186,4	13,1	6.205,4	953,4	105	0,952
	Sim	201,3	170,6	87,8	329,3	110,6	5	
IgG anti- <i>P.aeruginosa</i> ³ (UA/mL)	Não	290,1	103,2	13,3	3.567,8	508,3	105	0,447
	Sim	68,1	64,3	23,1	107	32,2	5	

Resultado do EEG com distribuição gama; * Resultado do EEG com distribuição normal;
1. *Streptococcus B*; 2. *Klebsiella pneumoniae*; 3. *Pseudomonas aeruginosa*

Os recém-nascidos que receberam colostro nos primeiros dias de vida apresentaram frequência significativamente menor de infecção em relação aos que não foram alimentados ou receberam fórmula. Este resultado está apresentado nos dados da Tabela 18.

Tabela 18 - Análise da ocorrência de sepse neonatal, conforme a ingestão de colostro

Colostro	Sepse				Total	p
	Não		Sim			
	n	%	n	%		
Não	13	72,2	5	27,8	18	<0,001
Sim	84	100,0	0	0,0	84	
Total	97	95,1	5	4,9	102	

Resultado do EEG com distribuição binomial

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Durante o período do estudo, foram incluídos 57 pares de gêmeos, compondo a casuística de 114 recém-nascidos. O tipo de parto mais frequente foi cesáreo, e a maioria dos gemelares foi prematuro tardio com baixo peso ao nascimento, fato justificado pela gemelaridade. A mediana do tempo de internação dos recém-nascidos foi 3 dias, possibilitando a observação clínica destes quanto à ingestão de colostro. Somente um neonato recebeu alta hospitalar antes de completar 72 horas.

A presença de anticorpos IgG totais e específicos anti-*Streptococcus* B, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* foi detectada no sangue umbilical de todos os recém-nascidos. Este achado comprova a passagem transplacentária destes anticorpos, conforme já descrito, em 1958, por Brambell⁽⁶⁰⁾. Em gestações únicas, há evidência de que a transferência de IgG depende do nível de IgG materna, da idade gestacional, da integridade placentária, da subclasse do anticorpo e da natureza do antígeno⁽¹⁵⁾.

A concentração sérica de anticorpos IgG totais que observamos, de 835,31mg/dL, é concordante com o estudo de Brasil⁽⁶¹⁾, realizado em 2008. A concentração média de IgG total dos recém-nascidos foi 866,3 ± 325,3 mg/dL, semelhante à observada no presente estudo.

Outros autores demonstraram a passagem transplacentária de anticorpos para diferentes patógenos, como *Streptococcus* do grupo B, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*,

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae* tipo b, vírus do sarampo, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, vírus da rubéola e *Neisseria meningitidis* sorogrupo C⁽⁶¹⁻⁶⁶⁾.

A literatura é escassa quanto à avaliação da passagem transplacentária de anticorpos em gêmeos. Bryan et al.⁽⁶⁷⁾ analisaram a concentração de anticorpos IgG em 50 gestações gemelares com amostras pareadas de sangue da mãe e do cordão umbilical dos recém-nascidos. Os autores detectaram anticorpos IgG em todas amostras, com concentrações semelhantes às dos recém-nascidos provenientes de gestações únicas da mesma idade gestacional. A concentração média de anticorpos séricos IgG dos primeiro e segundo gemelares, respectivamente, foi 831 mg/dL e 741 mg/dL, concentrações semelhantes às que verificamos, ou seja, IgG do primeiro gemelar $845,1 \pm 184,9$ mg/dL e IgG do segundo gemelar $826,3 \pm 197,6$ mg/dL.

Analisando os recém-nascidos a termo e prematuros, observamos que o grupo de prematuros apresentou valores significativamente menores de anticorpos IgG totais. Com relação aos anticorpos IgG anti-*Streptococcus B* e anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, não houve diferença. Conforme apresentado na Tabela 2, constatamos que o valor mediano da idade gestacional dos 114 gemelares foi 36,3 semanas, com valor médio de $36,0 \pm 1,7$ semanas. Entre os recém-nascidos a termo, a maior idade gestacional foi 38 semanas. Isso mostra que a maioria dos neonatos apresentava idade gestacional muito próxima, entre 36 e 38 semanas, o que pode justificar, em parte, a ausência de

diferença significativa na concentração de anticorpos IgG anti-*Streptococcus* B e anti-LPS *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* na comparação dos grupos de recém-nascidos a termo e prematuros. Outros autores estudaram a transferência transplacentária de anticorpos séricos IgG totais e IgG anti-*Streptococcus* B em recém-nascidos únicos, demonstrando que a passagem transplacentária foi menos eficiente nos recém-nascidos prematuros em relação aos neonatos a termo ^(61,62).

Nos recém-nascidos gemelares com idade gestacional inferior a 34 semanas, observamos que, além da menor concentração de anticorpos IgG totais ($p=0,013$), houve diminuição na concentração de anticorpos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* ($p=0,032$). Este resultado indica que o grau de prematuridade influenciou na concentração desses anticorpos. A passagem transplacentária de anticorpos depende da idade gestacional e, possivelmente, do tipo de antígeno avaliado.

A idade gestacional a partir da qual os anticorpos são transferidos, e a variabilidade desse processo considerando-se as diferentes idades gestacionais, é pouco conhecida, especialmente em gestações gemelares. Por outro lado, não houve diferença significativa entre a idade gestacional e a concentração de IgG anti-*Streptococcus* B e IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*. É possível que este resultado seja em razão da exclusão dos prematuros tardios na análise comparativa. Alguns autores destacaram a importância do último trimestre da gestação na passagem transplacentária de anticorpos. Para melhor compreender a transferência de anticorpos em

prematturos, são recomendados estudos com casuísticas maiores em diferentes faixas de idade gestacional.

Há poucos estudos sobre a influência do grau de prematuridade na transferência transplacentária de anticorpos contra bactérias gram-negativas e *Streptococcus B*. Lessa et al. ⁽⁶²⁾, em 2011, estudaram a aquisição passiva de anticorpos IgG reativos com LPS de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em recém-nascidos a termo, prematturos entre 33 e 36 6/7 semanas e menores que 33 semanas. Os níveis de IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* e de *E.coli* O26 e O111 nos prematturos foram significativamente mais baixos quando comparados aos recém-nascidos a termo. Entre os prematturos, o grupo com idade gestacional inferior a 33 semanas apresentou redução significativa na transferência de anticorpos IgG anti-LPS de *E.coli* O111.

Considerando que, nas gestações gemelares, frequentemente há necessidade de resolução antes do termo, a menor transferência de anticorpos representa um fator de risco para infecção de grande importância a ser considerado nesse grupo de pacientes.

Em cerca de 20% das gestantes, a colonização vaginal por *Streptococcus B* foi positiva. No entanto, não foi observada associação entre colonização e maior concentração de anticorpos IgA anti-*Streptococcus B* no colostro. A razão para esse achado ainda não está elucidada. Existem estudos sugerindo diferenças de imunogenicidade do *Streptococcus B*, de acordo com o local de colonização materna, idade materna, sorotipo, entre outros fatores.

Hordnes et al. ⁽⁶⁸⁾ estudaram a relação entre a colonização materna genital e retal para *Streptococcus* B em gestantes com 17 semanas e a concentração de anticorpos IgG e IgA reativos com esta bactéria na secreção cervical uterina e no sangue. Os autores encontraram maior concentração de anticorpos IgA e IgG anti-*Streptococcus* B na secreção cervical uterina e maior concentração de anticorpos séricos IgA anti-*Streptococcus* B em gestantes com colonização retal. Para a colonização cervical uterina, o achado de maior concentração de anticorpos IgA e IgG anti-*Streptococcus* B na secreção cervical uterina repetiu-se, porém, não houve diferença nos anticorpos séricos dessas gestantes. Os autores sugerem que a maior concentração de anticorpos séricos IgA anti-*Streptococcus* B em gestantes com colonização retal estão relacionados ao fato do cólon e do reto serem ricos em tecido linfoide associado à mucosa, com maior indução à produção de IgA; por outro lado, a mucosa uterina é pobre em tecido linfoide e não apresenta equivalente da célula M intestinal, com menor indução à produção de IgA. A célula M está presente em sítios de indução no intestino, tecido linfoide associado à mucosa nasal, tonsilas palatinas, adenoides e sistema respiratório. Representam, aproximadamente, 2% das células epiteliais das placas de Peyer e exercem função importante no processamento do antígeno e indução de imunidade antígeno-específica estimulada pela mucosa. As células T e B destes sítios indutores migram por meio do ducto torácico, e, corrente sanguínea para sítios efetores, como a glândula mamária, fazendo com que a imunidade gerada na mucosa seja transmitida ao recém-nascido pelo leite materno ⁽⁶⁹⁾.

No presente estudo, conforme a rotina da Instituição foi realizada coleta simultânea em colo uterino e ânus para pesquisa de *Streptococcus B*, considerando-se positivo o crescimento da bactéria independentemente do local de colonização. Por esse motivo, não foi realizada a análise das concentrações de anticorpos IgA anti-*Streptococcus B*, de acordo com o local de colonização.

Campbell et al. ⁽⁷⁰⁾ estudaram 3.307 gestantes das quais 856 (26%) eram colonizadas por *Streptococcus B*. Foi observada concentração significativamente maior de anticorpos séricos IgG anti-*Streptococcus B* na ocasião do parto em 52% das gestantes, porém, como foi observado por nós para IgA específica no colostro, 48% das gestantes não apresentaram aumento das concentrações destes anticorpos em decorrência de colonização positiva. Isso ocorreu, sobretudo, nas gestantes adolescentes, sugerindo que a idade materna exerce influência na resposta imune secundária à colonização por *Streptococcus B*. Na presente casuística, houve poucos filhos de mães nos extremos de idade, não sendo possível analisar a influência da idade materna na resposta imune secundária à colonização por *Streptococcus B*.

Davies et al. ⁽⁷¹⁾ estudaram uma coorte de 1.207 gestantes no Canadá, constatando que 19,5% das mesmas eram colonizadas por *Streptococcus B*, sendo o sorotipo III, presente em 20,6% das gestantes, responsável por 37% dos casos de doença invasiva neonatal por esta bactéria ($p < 0,01$). A produção de anticorpos maternos séricos IgG anti-*Streptococcus B* em resposta à colonização pelo sorotipo III foi menos

eficiente quando comparada à resposta gerada pelos sorotipos Ia, Ib, II e V. O sorotipo III foi mais invasivo do que os outros sorotipos nessa população, os autores associam essa maior morbidade da doença à menor concentração de anticorpos da classe IgG anti-*Streptococcus* B sorotipo III. No presente estudo o *Streptococcus* B analisado foi o sorotipo III, fato que pode ter contribuído para menor produção de anticorpos reativos ao *Streptococcus* B.

Analisando a concentração de anticorpos séricos IgG específicos do primeiro e do segundo gemelar, constatamos que houve diferença entre os gêmeos. A concentração de anticorpos séricos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* foi significativamente menor no segundo gemelar. Consideramos esse achado de interesse para o direcionamento de futuras pesquisas. Até o momento, há descrições de maior morbidade e mortalidade do segundo gemelar em relação ao primeiro, justificada por fatores relacionados ao parto e asfixia perinatal ^(72, 73).

Quanto à influência da classificação gestacional, verificamos diminuição significativa na concentração de anticorpos séricos IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* nos recém-nascidos pequenos para a idade gestacional. Esse comportamento não foi observado para os anticorpos séricos IgG totais, anti-*Streptococcus* B e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*. Na literatura que consultamos, existe apenas um estudo analisando a influência da classificação gestacional na transferência de anticorpos da classe IgG. Yeung et al. ⁽⁷⁴⁾ analisaram amostras de sangue de cordão umbilical em 182 recém-nascidos únicos e verificaram menor

concentração de anticorpos séricos IgG totais em 28 neonatos pequenos para a idade gestacional.

Com relação ao gênero, não houve diferença significativa da concentração de anticorpos séricos IgG totais, e específicos, anti-*Streptococcus* B, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS-*Pseudomonas aeruginosa*, embora no período neonatal a incidência de sepse no gênero masculino tenha sido maior que no feminino⁽⁷⁵⁾. Shrestha et al.⁽⁷⁶⁾ descreveram em uma coorte de 120 neonatos, maior ocorrência de sepse neonatal em recém-nascidos do gênero masculino em relação ao feminino (razão 1,2:1). Tyson et al.⁽⁷⁷⁾ estudaram 4.446 prematuros extremos e observaram mortalidade menor entre recém-nascidos do gênero feminino.

A conferência de imunidade por meio do colostro ocorre por mecanismo diferente da imunidade transplacentária. Até o momento, esses mecanismos ainda não são totalmente conhecidos. O colostro possui inúmeros fatores bioativos que exercem proteção contra a infecção, dentre eles, as imunoglobulinas. A presença de IgA secretora no colostro constitui uma barreira de grande eficácia contra a invasão de patógenos na mucosa intestinal.

No colostro, a análise dos anticorpos IgA totais e específicos anti-*Streptococcus* B, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* mostrou detecção dos mesmos em 51 mães (98,1%). Em uma mãe, não houve detecção de IgA no colostro, sendo a mesma excluída da análise pela possibilidade de tratar-se de paciente com deficiência congênita de IgA.

O comportamento da concentração dos anticorpos no colostro foi diferente, de acordo com a idade gestacional e o tipo de antígeno estudado. A concentração de anticorpos IgA totais e IgA anti-*Streptococcus* B não sofreu influência da idade gestacional. Houve diminuição da concentração de IgA anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* na comparação entre recém-nascidos a termo e prematuros. A concentração média de anticorpos da classe IgA anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* foi significativamente menor no colostro de mães cujo parto ocorreu antes de 34 semanas de gestação ($p=0,001$). Este resultado parece indicar que a proteção conferida pelo colostro em relação à *Klebsiella pneumoniae* e à *Pseudomonas aeruginosa* é menor no grupo de prematuros. Entretanto, estudos comparando a concentração de IgA secretora no colostro de mães de recém-nascidos prematuros e a termo mostram concentrações significativamente maiores no colostro das mães de prematuros ⁽⁷⁸⁾. Este achado reflete a existência de uma resposta imunológica adaptativa no colostro de mães com parto prematuro, visando a proteger a mucosa intestinal imatura contra a invasão de microrganismos ⁽⁷⁹⁾.

A IgA secretora é o anticorpo mais importante no leite humano, seguido pela IgM secretora e IgG, juntos eles representam 88%-94% do total de imunoglobulinas presentes no leite materno. A concentração de IgA secretora é bem maior no colostro (12 mg/mL) que no leite maduro (1 mg/mL), considera-se que, em média, um recém-nascido em aleitamento exclusivo receba entre 0,5 a 1 g de IgA secretora por dia ^(68, 80). A produção desta imunoglobulina pelos linfócitos que migraram do sistema respiratório,

e, intestinal, refletem a flora anterior e recente às quais a mãe foi exposta. Desta forma, o colostro materno modula a exposição da mucosa intestinal do neonato aos micro-organismos e limita a translocação bacteriana ⁽⁸¹⁾, constituindo um mecanismo protetor de grande importância contra a sepse neonatal.

Considerando a grande vulnerabilidade do recém-nascido prematuro à infecção, é essencial o conhecimento do tipo de anticorpos presentes no colostro, de acordo com as bactérias mais incidentes na sepse neonatal. O resultado que obtivemos indica que a transferência por meio do colostro pode variar, de acordo com o tipo de bactéria considerada e conforme a memória imunológica materna e seu repertório individual de anticorpos. Em estudo realizado no Brasil, Palmeira et al.⁽⁸²⁾ encontraram IgA reativos com *Escherichia coli* produtora de toxina shiga e *Escherichia coli* enteropatogênica, no colostro de 51 mães moradoras de área endêmica para essas bactérias.

Sabe-se que a *Klebsiella pneumoniae* é uma das principais bactérias implicadas na etiologia da sepse neonatal. Verificamos que o recém-nascido prematuro com idade gestacional inferior a 34 semanas, embora tenha recebido anticorpos por via transplacentária na mesma magnitude dos prematuros tardios e a termo, teve menor oferta de anticorpos IgA anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* por meio do colostro.

Observamos que a taxa de sepse entre os neonatos gemelares estudados foi 4,3% (5 casos). Neste grupo, verificamos que a concentração sérica de anticorpos IgG totais foi significativamente mais baixa em relação

aos neonatos sem infecção. Estudos epidemiológicos documentaram o fato de que os anticorpos maternos modificam a incidência e gravidade das infecções⁽⁸³⁾. Lin et al.^(84, 85) mostraram que recém-nascidos de mães com concentrações de anticorpos anti-*Streptococcus* B sorotipo Ia maior que 5 µg/mL, apresentavam risco de desenvolver sepse por essa bactéria 88% menor em relação aos filhos de mães com níveis de anticorpos anti-*Streptococcus* B sorotipo Ia inferior a 0,5 µg/mL. Os autores observaram também que filhos de mães com níveis de anticorpos anti-*Streptococcus* B sorotipo III acima de 10 µg/mL apresentavam risco de desenvolver sepse por essa bactéria 91% menor em relação aos filhos de mães com níveis de anticorpos anti-*Streptococcus* B sorotipo III inferiores a 2 µg/mL. Resultados semelhantes foram encontrados por Baker et al.⁽⁸⁶⁾ entre a concentração de anticorpo materno e risco relativo de infecção para sepse precoce por *Streptococcus* B. Os autores demonstraram que os filhos de mães com concentração de anticorpos anti-*Streptococcus* B Ia, III e V maior ou igual a 1,0 µg/mL tinham chances 70% menor de desenvolver sepse por esse agente. Larsson et al.⁽⁸⁷⁾ também observaram associação entre concentração de anticorpos e infecção. Os autores comprovaram que existe passagem transplacentária de anticorpos reativos com proteínas α e Rib (proteínas capsulares do *Streptococcus* B) e que baixas concentrações destes anticorpos estão associadas à infecção invasiva por *Streptococcus* B que expressem estas proteínas.

As bactérias causadoras de sepse foram *Staphylococcus epidermidis* (2 casos), *Acinetobacter baumannii* (1 caso), *Staphylococcus aureus* (1 caso)

e *Klebsiella pneumoniae* (1 caso). Portanto, um paciente apresentou sepse por *Klebsiella pneumoniae*. Este paciente não recebeu colostro e o diagnóstico de sepse neonatal tardia foi feito com 12 dias de vida. A mãe deste RN apresentou, em seu colostro, concentração de IgA anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* de 3.623,8 UA/mL, o qual foi semelhante ao valor médio obtido. No entanto, a concentração placentária de IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* (305,9 UA/mL) foi inferior à média dos recém-nascidos (504,7 UA/mL). Na literatura consultada, não há estudos sobre esse tema, porém consideramos que, para analisar com maior exatidão esse comportamento, seria necessário um número maior de pacientes.

Entre os pacientes com hemocultura negativa, dois tiveram diagnóstico de infecção, sendo sepse clínica precoce (1 caso) e conjuntivite por *Pseudomonas aeruginosa* (1 caso). A conjuntivite por *Pseudomonas aeruginosa* é uma infecção focal grave, pela rápida destruição dos tecidos oculares e disseminação causando sepse e meningite. Shah et al.⁽⁸⁸⁾ estudaram 18 recém-nascidos com isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* na conjuntiva e encontraram bacteremia em cinco pacientes, dos quais três apresentaram meningite e dois morreram. No paciente da presente casuística que apresentou conjuntivite por *Pseudomonas aeruginosa* observamos concentração elevada de anticorpo sérico IgG anti-LPS *Pseudomonas aeruginosa* (1870,4 UA/mL) no cordão umbilical. É possível que a maior concentração de anticorpos IgG anti-LPS *Pseudomonas aeruginosa* tenha evitado o desenvolvimento de sepse.

O par de gêmeos de menor idade gestacional (29 semanas) apresentou infecção por *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente, tendo o segundo gemelar falecido (Tabela 14, caso 4). Embora a aquisição passiva de anticorpos para esses agentes não tenha sido objeto deste estudo, é provável que a transferência de anticorpos para este feto estivesse bastante reduzida na época da gestação.

Observamos que os recém-nascidos que receberam colostro apresentaram frequência significativamente menor de infecção em relação àqueles que não receberam, indicando a importância da proteção anti-infecciosa conferida pelo colostro. Esse achado está de acordo com a literatura, outros autores demonstraram que o leite materno exerce proteção contra episódios de infecção como sepse tardia, enterocolite necrosante e infecção do trato urinário⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾. Schanler et al.⁽⁹²⁾ em estudo realizado no Texas, em 108 recém-nascidos prematuros, encontraram que os alimentados com leite materno tiveram menor incidência de sepse tardia e enterocolite necrosante em relação aos neonatos que receberam fórmula.

Dentre as limitações do presente estudo, a maior concentração da idade gestacional entre 36 e 38 semanas pode ter influenciado os resultados obtidos. Seria recomendado estudar um número maior de neonatos em diferentes faixas de idade gestacional. Além disso, o número pequeno de publicações sobre aquisição passiva de anticorpos em recém-nascidos gemelares limitou a comparação dos resultados que obtivemos com estudos de outros autores.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

O presente estudo nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

- A presença de anticorpos IgG totais e específicos anti-*Streptococcus* B, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* foi detectada no sangue de todos os recém-nascidos gemelares;
- A concentração sérica média de anticorpos nos recém-nascidos gemelares foi: 835,71 ± 190,73 mg/dL (IgG total); 295,1 ± 250,66 UA/mL (IgG anti-*Streptococcus* B); 504,75 ± 933,93 UA/mL (IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*) e 280,04 ± 498,66 UA/mL (IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*);
- Nos recém-nascidos gemelares prematuros, a concentração sérica de anticorpos IgG totais foi significativamente menor em relação aos recém-nascidos a termo;
- Os recém-nascidos gemelares prematuros com idade gestacional inferior a 34 semanas apresentaram diminuição significativa na concentração de anticorpos séricos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*. Este achado é concordante com a gravidade da infecção por esta bactéria em prematuros de idade gestacional muito baixa;

- Nos recém-nascidos gemelares pequenos para a idade gestacional, observou-se diminuição significativa da concentração de anticorpos séricos IgG anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*;
- Entre os neonatos gemelares que apresentaram sepse, a concentração sérica de anticorpos IgG totais foi significativamente menor quando comparados àqueles sem infecção;
- A frequência de sepse foi significativamente menor entre os recém-nascidos gemelares que receberam colostro. A importância do colostro na proteção contra infecção por bactérias gram-negativas e *Streptococcus B* ficou evidenciada pela detecção de anticorpos IgA totais e específicos anti-*Streptococcus B*, anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae* e anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* em 98,1% das mães de recém-nascidos gemelares;
- A concentração média de anticorpos no colostro das mães de recém-nascidos gemelares foi: 210,2 ± 285,3 mg/dL (IgA totais); 6.640 ± 9.526,8 UA/mL (IgA anti-*Streptococcus B*); 3.070,1 ± 2.886,6 UA/mL (IgA anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*) e 3.231,0 ± 2.935,2 UA/mL (IgA anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*); e
- O colostro das mães de recém-nascidos gemelares prematuros mostrou concentração significativamente menor de IgA anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*. Quando a idade gestacional foi inferior a 34 semanas, a concentração de IgA anti-LPS de *Klebsiella*

pneumoniae também foi significativamente menor, sugerindo que o grau de prematuridade influenciou a transferência de anticorpos pelo colostro.

7 Anexos

7 ANEXOS

Anexo A – Termo de Aprovação da CAPPesq



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0500/11

Título: TRANSFERÊNCIA DE ANTIICORPOS EM GESTAÇÕES MÚLTIPLAS

Pesquisador Responsável: Adolfo Werjow Liao

Pesquisador Executante: Sônia Christina Leme Stach

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 19/06/2013, o(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 14/03/2013 - Relatório parcial e inclusão da Profa. Dra. Rossana Pulcinelli Vieira Francisco e Dra. Renata de Araújo Monteiro Yoshida

•Carta datada de 06/06/2013 - Subprojeto que será tese de mestrado da Dra. Renata de Araújo Monteiro Yoshida com o título "Evolução neonatal e perfil dos anticorpos anti-Streptococcus B, anti-LPS de Klebsiella e Pseudomonas e IgA em gêmeos", tendo como orientadora a Profa. Dra. Vera Lúcia Jornada Krebs -

Subprojeto que será tese de doutorado da Dra. Sônia Christina Leme Stach com o título "Transferência Transplacentária de anticorpos em gestações gemelares", tendo como orientadora a Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot

CAPPesq, 25 de Junho de 2013

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Vice Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Goenka A, Kollmann TR. Development of immunity in early life. *J Infect.* 2015;71(Suppl 1):S112-20.
2. Delves PJ, Roitt IM. The immune system: first of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(1):37-49.
3. Lewis DB, Wilson CB. Developmental immunology and role of host defenses in fetal and neonatal susceptibility to infection. In: Remington, JS. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2010. p.80-191.
4. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):379-90.
5. Cuenca AG, Wynn JL, Moldawer LL, Levy O. Role of innate immunity in neonatal infection. *Am J Perinatol.* 2013;30(2):105-12.
6. Dowling DJ, Levy O. Ontogeny of early life immunity. *Trends Immunol.* 2014;35(7):299-10.
7. PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, King C, Levy O, Ramilo O, Siegrist CA. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat Rev Immunol.* 2011;12(3):189-94.
8. Elahi S, Ertelt JM, Kinder JM, Jiang TT, Zhang X, Xin L, Chaturvedi V, Strong BS, Qualls JE, Steinbrecher KA, Kalfa TA, Shaaban AF, Way SS. Immunosuppressive CD71⁺ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature.* 2013;504(7478):158-62.

9. Peakman M, Vergani D. *Basic and clinical immunology*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 2009. p.35-53: Acquired immunity: antigen receptors.
10. Williams CB, Eisenstein EM, Cole FS. Immunology of the fetus and newborn. In: Gleason CA, Devaskar SU, Avery ME. *Avery's diseases of the newborn*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2012. p. 445-67.
11. Lewis DB, Gern JE, Hill HR, Friedlander SL, La Pine TR, Lemanske Jr RF, Stiehm ER. Newborn immunology: relevance to the clinician. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2006;36:189-204.
12. Englund JA. The influence of maternal immunization on infant immune responses. *J Comp Path*. 2007;137:S16-19.
13. Simister NE, Story CM. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J Reprod Immunol*. 1997;37(1):1-23.
14. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*. 2003;21(24):3365-69.
15. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Develop Immunol*. 2012;2012:1-13.
16. Maleck A, Sager R, Kuhn P, Nicolaidis KH, Schneider H. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1996;36:248-55.
17. Maleck A, Sager R, Schneider H. Maternal-fetal transport of immunoglobulin G and its subclasses during the third trimester of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1994;32:8-14.

18. Stiehm ER, Fudenberg HH. Serum levels of immune globulins in health and disease: a survey. *Pediatrics*. 1966;37:715-27.
19. Lee SI, Heiner DC, Wara D. Development of serum IgG subclasses levels in children. *Monogr Allergy*. 1986;19:108-21.
20. Saxon A, Stiehm ER. The B-lymphocyte system. In: Stiehm ER. *Immunologic disorders in infants and children*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 1989. p.40-67.
21. WHO Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant mortality. Effect of breastfeeding in infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. *Lancet*. 2000;355:451-5.
22. Kelleher SL, Lonnerdal B. Immunological activities associated with milk. *Adv Nutr Res*. 2001;10:36-65.
23. Groer M, Ashmeade T, Duffy A, Morse S, Zaritt J. Changes in the immune components of preterm human milk and associations with maternal and infant characteristics. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2016;45(5):639-48.
24. Kleinman RE, Walker WA. The enteromammary immune system. *Digest Dis Sci*. 1979;24(11):876-82.
25. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*. 2003;21:3382-88.
26. Yan H, Lamm ME, Björling E, Huang YT. Multiple functions of immunoglobulin A in mucosal defense against viruses: an in vitro measles virus model. *J Virol*. 2002;76(21):10972-9.

27. Bomsel M, Heyman M, Hocini H, Lagaye S, Belec L, Dupont C. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity*. 1998;9(2):277-87.
28. Hanson LA. Breast-feeding and protection against infection. *Scand J Food Nutr*. 2006;50:32-4.
29. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, Cousens S, Mathers C, Black RE. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. 2015;385:430-40.
30. Lawn JE, Blencowe H, Oza S, You D, Lee AC, Waiswa P, Lalli M, Bhutta Z, Barros AJ, Christian P, Mathers C, Cousens SN, Lancet Every Newborn Study Group. Every newborn: progress, priorities, and potential beyond survival. *Lancet*. 2014;384(9938):189-205.
31. Ananth CV, Chauhan SP. Epidemiology of twinning in developed countries. *Semin Perinatol*. 2012;36(3):156-61.
32. Hamilton BE, Martin JA, Osterman MJK, Curtin SC, Mathews TJ. Births: final data for 2014. *Natl Vital Stat Rep*. 2015;64(12):1-64.
33. Chauhan SP, Scardo JA, Hayes E, Abuhamad AZ, Berghella V. Twins: prevalence, problems, and preterm births. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;203(4):305-15.
34. Deutsch AD, Leite RMG, Barros VB, Calil VMLT, Krebs VLJ, Vaz FAC. *Prevalência e mortalidade de recém-nascidos provenientes de gestações múltiplas em unidade neonatal de nível terciário*. XIX Congresso Brasileiro de Pediatria. Fortaleza, CE: 25 a 28 de novembro de 2007.

35. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemos JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Krones SB, Shankaran S, Laptook AR, Steveson DK, Papile LA, Poole WK. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD neonatal research network. *Pediatrics*. 2002;110:285-91.
36. Bizzarro MJ, Raskind C, Baltimore RS, Gallagher PG. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. *Pediatrics*. 2005;116(3):595-602.
37. Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis an old problem with new insights. *Virulence*. 2014;5(1):170-8.
38. Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal infectious diseases: evolution of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(2):367-89.
39. Zea-Vera A, Ochoa TJ. Challenges in the diagnosis and management of neonatal sepsis. *J Trop Pediatr*. 2015;61(1):1-13.
40. Stoll BJ, Hansen NI, Sánchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs K, Bizzarro MJ, Goldberg RN, Frantz ID, Hale EC, Shankaran S, Kennedy K, Carlo WA, Watterberg KL, Bell EF, Walsh MC, Schibler K, Laptook AR, Shane AL, Schrag SJ, Das A, Higgins R. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E.coli* disease continues. *Pediatrics*. 2011;127(5):817-26.
41. Jeong H, Han SJ, Yoo HN, Choi SJ, Oh SY, Kim YJ, Roh CR, Kim JH. Comparison of changes in etiologic microorganisms causing early-onset neonatal sepsis between preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015;28(16):1923-8.

42. Downie L, Armiento R, Subhi R, Kelly J, Clifford V, Duke T. Community-acquired neonatal and infant sepsis in developing countries: efficacy of WHO's currently recommended antibiotics-systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*. 2013;98(2):146-54.
43. Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA*. 2008;299(17):2056-65.
44. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B Streptococcal disease: a public health perspective. *MMWR Recomm Rep*. 1996;45(RR-7):1-24.
45. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B Streptococcal disease – revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep*. 2002;51(RR-11):1-22.
46. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B Streptococcal disease. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59(RR-10):1-34.
47. Embree EJ, Alfattoh NI. Infections in the newborn. In: Gleason CA, Devaskar SU, Avery ME. *Avery's neonatology pathophysiology and management of the newborn* 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. p.930-1169.
48. Nizet V, Klein OJ. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington, JS *Infectious diseases of the fetus and newborn*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2010. p.222-75.

49. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013;45(12):1-9.
50. Mai JY, Zhu ML, Chen C, He XL, Lin ZL. Clinical characteristics of neonatal *Klebsiella pneumoniae* sepsis and the antibiotic sensitivity pattern of strains. *Chin J Contemp Pediatr*. 2010;12(9):700-3.
51. Karlowicz MG, Buescher ES, Surka AE. Fulminant late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit 1988-1997, and the impact of avoiding empiric vancomycin therapy. *Pediatrics*. 2000;106(6):1387.
52. Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestacional age in newborn infant. *J Pediatr*. 1978;93:120-2.
53. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr*. 1991;119:417-23.
54. Alexander GR, Kogan M, Martin J, Papiernik E. What are the fetal growth pattern of singletons, twins, and triplets in the United States? *Clin Obstet Gynecol*. 1998;41(1):114-25.
55. Haque KN. Definitons of bloodstream infection in the newborn. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(3 Suppl):S45-49.
56. Goldstein B, Giroir B, Randolph A; International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International Pediatric Sepsis consensus Conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(1):2-8.

57. Quinello C, Quintilio W, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P. Passive acquisition of protective antibodies reactive with *Bordetella pertussis* in newborns via placental transfer and breast-feeding. *Scand J Immunol*. 2010;72(1):66-73.
58. Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006. p.502.
59. McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. 2nd ed. New York: Chapman and Hall; 1989. p.511.
60. Brambell FWR. The passive immunity of the young mammal. *Biological Reviews*. 1958;22(4):488-531.
61. Brasil TB. *Transferência transplacentária de anticorpos anti-Streptococcus B nos recém-nascidos de termo e pré-termo*. Dissertação (mestrado). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.
62. Lessa ALS, Krebs VLJ, Brasil TB, Pontes GN, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P. Preterm and term neonates transplacentally acquire IgG antibodies specific to LPS from *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;62(2):236-43.
63. Carvalho BTC, Carneiro-Sampaio MM, Solé D, Naspitz C, Leiva LE, Sorensen RU. Transplacental transmission of serotype-specific pneumococcal antibodies in a brazilian population. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(1):50-4.

64. Nagao AT, Carvalho BTC, Arslanian C, Solé D, Carneiro-Sampaio MM. Placental transfer of IgG antibodies against *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide in brazilian term and preterm newborns. *J Trop Pediatr*. 1999;45(3):171-3.
65. Okoko BJ, Wesuperuma LH, Ota MO, Pinder M, Banya W, Gomez SF, McAdam KP, Hart AC. The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural West African population. *J Infect Dis*. 2011;184(5):627-32.
66. van den Berg JP, Westerbeek EA, Berbers GA, van Gageldonk PG, van der Klis FR, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies specific for pertussis, diphtheria, tetanus, *Haemophilus influenzae* type b, and *Neisseria meningitidis* serogroup C is lower in preterm compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(9):801-5.
67. Bryan EM, Slavin B, Nicholson E. Serum immunoglobulins in multiple pregnancy. *Arch Dis Child*. 1976;51:354-9.
68. Hordnes K, Tynning T, Kvam AI, Jonsson R, Haneberg B. Colonization in the rectum and uterine cervix with group B Streptococci may induce specific antibody responses in cervical secretions of pregnant women. *Infect Immun*. 1996;64(5):1643-52.
69. Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine*. 2003;21:3374-6.
70. Campbell JR, Hillier SL, Krohn MA, Ferrieri P, Zaleznik DF, Baker CJ. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet Gynecol*. 2000;96(4):498-503.

71. Davies HD, Adair C, McGeer A, Ma D, Robertson S, Mucenski M, Kowalsky L, Tyrell G, Baker CJ. Antibodies to capsular polysaccharides of group B Streptococcus in pregnant Canadian women: relationship to colonization status and infection in the neonate. *J Infect Dis.* 2001;184(3):285-91.
72. Wen SW, Kee FKF, Lawrence O, Kitaw D, Qiuying Y, Mark W. Neonatal morbidity in second twin according to gestational age at birth and mode of delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(3):773-7.
73. Armson BA, O'Connell C, Persad V, Joseph KS, Young DC, Baskett TF. Determinants of perinatal mortality and serious neonatal morbidity in the second twin. *Obstet Gynecol.* 2006;108(3Pt1):556-64.
74. Yeung CY, Hobbs JR. Serum gamma-globulin levels in normal premature, post-mature, and "small-for-dates" newborn babies. *Lancet.* 1968;291(7553):1167-70.
75. Shin YJ, Ki M, Foxman B. Epidemiology of neonatal sepsis in South Korea. *Pediatr Int.* 2009;51(2):225-32.
76. Shrestha RK, Rai SK, Khanal LK, Manda PK. Bacteriological study of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility pattern of isolates in Kathmandu, Nepal. *Nepal Med Coll J.* 2013;15(1):71-3.
77. Tyson JE, Parikh NA, Langer J, Green C, Higgins RD. Intensive care for extreme prematurity – moving beyond gestational age. *N Engl J Med.* 2008;358:1672-81.
78. Castellote C, Casillas R, Ramírez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Castell M, Maoretones MG, López-Sabater MC, Franch A. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr.* 2011;141(6):1181-7.

79. Hanson LA, Korotkova M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Semin Neonatol*. 2002;7(4):275-81.
80. Gregory KE, Walker WA. Immunologic factors in human milk and disease prevention in the preterm infant. *Curr Pediatr Rep*. 2013;1(4):1-11.
81. Hanson LA. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. *Am Allergy Asthma Immunol*. 1998;81(6):523-37.
82. 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(1):37-43.
83. Glezen WP. Effect of maternal antibodies on the infant immune response. *Vaccine*. 2003;21:3389-92.
84. Lin FY, Phillips III JB, Azimi PH, Weisman LE, Clark P, Rhoads GG, Regan J, Conception NF, Frasc CE, Troendle J, Brenner R, Gray BM, Bhushan R, Fitzgerald G, Moyer P, Clements JD. Level of maternal antibody required to protect neonates against early-onset disease caused by group *Streptococcus* type Ia: a multicenter, seroepidemiology study. *J Infect Dis*. 2001;184(8):1022-8.
85. Lin FY, Phillips III JB, Azimi PH, Weisman LE, Clark P, Rhoads GG, Regan J, Frasc CE, Troendle J, Brenner R, Gray BM, Moyer P, Clements JD. Level of maternal IgG anti-group B *Streptococcus* type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. *J Infect Dis*. 2004;190(5):928-34.

86. Baker CJ, Carey VJ, Rench MA, Edwards MS, Hillier SL, Kasper DL, Platt R. Maternal antibody at delivery protects neonates from early onset group B Streptococcal disease. *J Infect Dis*. 2014;209(5):781-8.
87. Larsson C, Lindroth M, Nordin P, Stalhammar-Carlemalm M, Lindahl G, Krantz I. Association between low concentrations of antibodies to protein α and rib and invasive neonatal group B streptococcal infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006;91(6):F403-8.
88. Shah SS, Gallagher PG. Complications of conjunctivitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a newborn intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17(2):97-102.
89. Schanler RJ. In time: human milk is the feeding strategy to prevent necrotizing enterocolitis. *Rev Paul Pediatr*. 2015;33(2):131-3.
90. Levy I, Comarsca J, Davidovits M, Klinger G, Sirota L, Linder N. Urinary tract infection in preterm infants: the protective role of breastfeeding. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(3):527-31.
91. Corpeleijn WE, Kouwenhoven SMP, Paap MC, Van Vliet I, Scheerder I, Muizer Y, Helder OK, van Goudoever JB, Vermeulen MJ. Intake of own mother's milk during the first days of life is associated with decreased morbidity and mortality in very low birth weight infants during the first 60 days of life. *Neonatology*. 2012;102(4):276-81.
92. Schanler RJ, Shulman RJ, Lau C. Feeding strategies for premature infants: beneficial outcomes of feeding fortified human milk vs preterm formula. *Pediatrics*. 1999;103:1150-7.