CAMILA CRISTINA QUINELLO GOMES DE FARIA

**Aquisição passiva de anticorpos protetores reativos
com *Bordetella pertussis* pelo recém-nascido via
transferência placentária e aleitamento materno**

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

Área de concentração: Pediatria
Orientadora: Dra. Patricia Palmeira

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Faria, Camila Cristina Quinello Gomes de

Aquisição passiva de anticorpos protetores reativos com *Bordetella pertussis* pelo recém-nascido via transferência placentária e aleitamento materno / . -- São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Patrícia Palmeira.

Descritores: 1.Imunização passiva 2.Aleitamento materno 3.Camundongos
4.Imunoglobulina G 5.Imunoglobulina A secretora 6.*Bordetella pertussis*

USP/FM/SBD-104/10

Aos meus pais e irmã

Dedico esta dissertação aos meus amados pais Arly e Marlene e minha querida irmã Carolina que sempre me incentivaram a dar este grande passo e, que mesmo com a distância e minha ausência, estiveram com toda dedicação ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem parte da minha vida, fonte de inspiração e apoio.

Agradecimento especial

Ao meu namorado e amigo Rafael, por me apoiar em todos os momentos e me incentivar cada vez mais a seguir em frente, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação. Agradeço sua atenção e companheirismo e, sobretudo, pelo amor incondicional que me conforta e me dá forças para superar obstáculos.

Agradecimento especial

À minha orientadora Dra. Patricia Palmeira pela oportunidade oferecida e, principalmente, por poder sempre contar com o seu entusiasmo contagiante, com a sua alegria e com a sua palavra amiga, de reconhecimento e de incentivo a cada momento. O apoio, a disponibilidade manifestada, a paciência e a confiança depositada contribuíram decisivamente para que este trabalho fosse realizado.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por me iluminar e me guiar todos os dias e por me abençoar com família e amigos maravilhosos.

Este espaço é dedicado a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Não sendo possível citar a todos, há, no entanto, alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero:

À Profa. Dra. Magda M. S. Carneiro-Sampaio por ter disponibilizado seu Laboratório permitindo, assim, a realização deste sonho.

Ao Dr. Wagner Quintílio, pela disponibilidade, paciência e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Às colegas do antigo Laboratório de Imunologia de Mucosas: Ana Lucia Silveira Lessa Marques, Elaine Cristina Cardoso, Mariana Acenjo Kmiliauskis, Simone Corrêa da Silva, Fabiana Ghilardi, Rosana Rezende de Oliveira, Denise Amazonas, Gerlândia Neres Pontes, Flávia Lima e Leuridan Torres, pela alegre convivência e companheirismo de todas as integrantes, em especial a Christina Arslanian Kubo pela paciência e dedicação em me auxiliar sempre que eu precisasse; e aos colegas do Laboratório de Imunologia Humana: Prof. Dr. Antônio Condino Neto, Josias Brito, Otávio Cabral Marques, Patrícia Macchiaverni, Paulo

Vitor Soeiro Pereira, Ângela Falcai, Walmir Cutrin Aragão Filho, Silvana Lucchini e Stefani Klaver.

À Dra. Hisako Gondo Higashi, diretora da Divisão Bioindustrial do Instituto Butantan pela atenção e por ter cedido gentilmente a suspensão de bactéria Bordetella pertussis utilizada nos testes “in vitro”.

À Dra. Solange Barros Carbonare, à Dra. Milene Tino de Franco e sua aluna Thalita Lopes Ferreira por disponibilizarem seu laboratório e reagentes, nos auxiliando nos ensaios de Immunoblotting.

À todos os profissionais do Hospital Universitário da USP, em especial às enfermeiras do Centro Obstétrico e à Wilma Monteiro Frésca do CONEP que sempre estiveram disponíveis para me ajudar quando precisasse.

Às mães que cederam gentilmente suas amostras para que fosse possível a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca examinadora do Exame de Qualificação: Dra. Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon, Dr. Hugo Issler e Dra. Solange Barros Carbonare que aceitaram gentilmente meu convite e contribuíram de forma muito construtiva com sugestões para o melhor desenvolvimento do nosso trabalho.

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

Às secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Pediatria, Caroline Aparecida Netto dos Santos, Adriana Trindade Bezerra, Solange Ribollo Bastieri Serodio e Ana Carolina Sabino Vieira, agradeço por estarem sempre prontamente dispostas para me auxiliarem no que fosse preciso.

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

Aos meus queridos amigos que sempre acreditaram em mim e me apoiaram para a realização deste sonho. Que mesmo eu estando ausente pela distância, nunca me deixaram no esquecimento. Obrigada pela energia positiva.

Agradeço à minha querida sogrinha Clotilde e meu sogro Seu Antônio por terem me acolhido em sua casa, me tratando carinhosamente como filha durante todo este período do Mestrado.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	23
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Casuística	25
3.2	Ética	26
3.3	Linhagens bacterianas	26
3.4	Preparo dos <i>Pools</i> das amostras	27
3.5	Absorção dos <i>Pools</i> de Soro e Colostro Humano Controle com <i>B. pertussis</i> inativada	28
3.6	Dosagem de anticorpos totais	29
3.6.1	Dosagem de IgG total por Imunodifusão Radial Quantitativa (IDRQ)	29
3.6.2	Dosagem de IgA total pelo método de ELISA	30
3.7	Dosagem de anticorpos específicos	31
3.7.1	Titulação de anticorpos IgG e IgA anti- <i>B. pertussis</i> pelo método de ELISA	31

3.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida	33
3.9	Ensaio de Immunoblotting	34
3.10	Avaliação da atividade funcional dos anticorpos IgG séricos e IgA secretores específicos em modelo experimental	35
3.10.1	Modelo experimental	35
3.10.2	Animais	35
3.10.3	Preparo da bactéria	35
3.10.4	Teste Controle Positivo	36
3.10.5	Teste Controle Negativo	36
3.10.6	Teste da capacidade neutralizante de anticorpos séricos e secretores	36
3.11	Análise Estatística	37
4.	RESULTADOS	40
4.1	Concentrações de anticorpos IgG totais	40
4.2	Concentrações de anticorpos IgA totais	42
4.3	Títulos de anticorpos IgG séricos anti- <i>Bordetella pertussis</i>	43
4.4	Títulos de anticorpos IgA séricos e secretores anti- <i>Bordetella pertussis</i>	45
4.5	Títulos de anticorpos IgG e IgA específicos dos <i>Pools</i> Teste de Soro e Colostro	46
4.6	Títulos de anticorpos IgG e IgA específicos dos <i>Pools</i> de Soro e Colostro Humano Controle absorvidos com <i>B. pertussis</i>	47

4.7	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	48
4.8	Ensaio de Immunoblotting	49
4.9	Capacidade neutralizante de anticorpos séricos e secretores	50
5.	DISCUSSÃO	57
6.	CONCLUSÃO	77
7.	ANEXOS	79
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	APÊNDICES	

ABREVIATURAS

AIG	Adequado para a idade gestacional
AGG	Aglutinógenos
AMPc	AMP cíclico
CO₂	Gás carbônico
CyaA	Adenil ciclase
D.O.	Densidade ótica
DE₅₀	Dose efetiva média
DL₅₀	Dose letal média
DNT	Toxina dermonecrótica
DTP	Vacina contra difteria, tétano e coqueluche
DTPa	Vacina acelular
DTPw	Vacina de célula total; vacina celular
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
et al	E outros
F(ab')²	Cadeia leve
Fc	Cadeia pesada
FcγR	Receptor Fc de IgG
FcRn	Receptor neonatal para porção Fc
FHA	Filamentos de hemaglutinina
FIM	Fímbrias
GPI	<i>The Global Pertussis Initiative</i>

Hib	<i>Haemophilus influenza</i>
IC	Intervalo de confiança
IDRQ	Imunodifusão radial quantitativa
IFN-γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LPS	Lipopolissacarídeo
MALT	Tecido linfóide associado à mucosa (<i>Mucosal associated lymphoid tissue</i>)
MHC-I	Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfato + Tween-20 a 0,1%
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIG	Pequeno para a idade gestacional
RN	Recém-nascido
rpm	Rotações por minuto
PRN	Pertactina
PT	Toxina pertussis
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio

SIgA	IgA secretória
TBS	Tampão Trizma-base
TCT	Citotoxina traqueal
TcfA	Fator de colonização traqueal
UOp	Unidades opacimétricas

RESUMO

Faria CCQG. **Aquisição passiva de anticorpos protetores reativos com *Bordetella pertussis* pelo recém-nascido via transferência placentária e aleitamento materno** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 116f.

Atualmente, a coqueluche representa um crescente problema de saúde pública em países desenvolvidos. Embora ainda não existam evidências de um aumento do número de casos de coqueluche no nosso país, não se pode descartar a hipótese de uma futura re-emergência da doença, pois dados epidemiológicos de algumas regiões revelam um aumento da incidência, indicando que provavelmente ocorra uma baixa notificação de novos casos ao Ministério da Saúde. A maioria dos casos ainda ocorre em lactentes menores de seis meses de idade, ou seja, crianças ainda não completamente imunizadas. Diversos trabalhos demonstraram a aquisição de anticorpos IgG reativos com *Bordetella pertussis* pelo recém-nascido através da passagem transplacentária, mas a partir dos dois meses de vida, observa-se um declínio substancial do título destes anticorpos. Neste caso, outro modo de conferir proteção ao neonato é através da transmissão de anticorpos IgA específicos pelo aleitamento materno, que poderia suprir a falta de anticorpos IgG até que o esquema de vacinação esteja completo. Os objetivos deste trabalho foram analisar a transferência passiva de anticorpos IgG e IgA anti-*B. pertussis* para o recém-nascido a termo e investigar a habilidade destes anticorpos em neutralizar a patogenicidade bacteriana em um modelo experimental *in vivo* utilizando camundongos desafiados por via intracerebral com *B. pertussis* viável. Foram coletadas 40 amostras pareadas de sangue materno, de cordão umbilical e de colostro. Foram demonstrados títulos equivalentes de anticorpos IgG anti-*B. pertussis* entre as amostras de soro materno e de cordão (medianas de 1:225 e 1:265, respectivamente) com taxa de transferência de 118%. Foram observados títulos variáveis de anticorpos IgA

específicos nas amostras de colostro materno com mediana de 1:74. O Immunoblotting realizado com extrato bruto de *B. pertussis* e *Pools* de soro materno, de soro de cordão e de colostro com alto e baixo título de anticorpos específicos revelou um perfil de reconhecimento idêntico entre os *Pools* de soro materno e dos respectivos neonatos. Os *Pools* de colostro apresentaram, em seu perfil de reconhecimento, diferentes intensidades que variaram de acordo com os títulos de anticorpos IgA específicos. No desafio intracerebral com *B. pertussis*, embora todos os *Pools* de soro materno, de cordão e de colostro tenham apresentado capacidade significativa de neutralizar a patogênia bacteriana quando comparados ao controle positivo, os *Pools* com alto título de anticorpos revelaram maior capacidade neutralizante. Os *Pools* de soro e colostro absorvidos com *B. pertussis* e, portanto, sem anticorpos IgG e IgA específicos, protegeram 30% dos animais testados e anticorpos IgG purificados, apresentando alto título de anticorpos anti-*B. pertussis* (1:2.560), protegeram 65% dos camundongos. Nossos dados confirmaram a transferência de anticorpos reativos com *B. pertussis* para o neonato via placenta e aleitamento materno e sua eficácia na neutralização da patogênese bacteriana, o que pode proteger a criança contra infecções respiratórias causadas por *Bordetella pertussis*.

Descritores: Imunização passiva, aleitamento materno, camundongos, imunoglobulina G, imunoglobulina A secretora, *Bordetella pertussis*.

SUMMARY

Faria CCQG. **Passive acquisition of protective antibodies reactive with *Bordetella pertussis* by the newborn via placental transfer and breast-feeding** [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 116f.

Pertussis is currently considered an important public health problem in developed countries. Although there is no evidence of an increase in the number of pertussis cases in our country, can not rule out the hypothesis of a future re-emergence of disease, as epidemiological data from some regions show an increase in incidence, indicating that probably there is a low report of new cases to the public health authorities. Most cases still occurs in infants under six months of age, i.e. children not fully immunized. Several works have demonstrated the acquisition of IgG antibodies reactive with *Bordetella pertussis* by the newborn through placental transfer, but by age of two months it was observed a substantial decay of titers these antibodies. In this case, another way to confer protection the neonate is through the transmission of IgA antibodies via breast-feeding, which could supply the lack of IgG antibodies until the vaccination schedule will be completed. The aims of this work were to analyze the passive transfer of IgG and IgA anti-*B. pertussis* antibodies to term newborns and to investigate the ability of these antibodies to neutralize the bacterial pathogenicity in an experimental model *in vivo* using mice intracerebrally challenged with viable *B. pertussis*. It was collected 40 paired samples of maternal blood, cord umbilical blood and colostrum. Equivalent titers of anti-pertussis IgG antibodies were demonstrated between maternal and cord serum samples (medians of 1:225 and 1:265, respectively) with transfer rate of 118%. It was observed variable specific IgA titers in maternal colostrum with a median of 1:74. Immunoblotting performed with *B. pertussis* crude extract and *Pools* of maternal serum, cord serum and colostrum with high and low specific antibody titers revealed an identical recognition profile between paired maternal and newborn serum

Pools. Colostrum *Pools* presented, in their recognition profile, different intensities that varied according to specific IgA antibody titers. In the intracerebral challenge with *B. pertussis*, although all maternal and cord serum and colostrum *Pools* presented a significant bacterial neutralizing ability when compared with positive control group, *Pools* with high antibody titers revealed higher neutralizing capacity. Serum and colostrum *Pools* absorbed with *B. pertussis* and, thus, without specific IgG and IgA antibodies, protected 30% of the animals tested and purified IgG antibodies, presenting a high anti-pertussis antibody titer (1:2,560), protected 65% of the mice. Our data confirmed the transfer of antibodies reactive with *B. pertussis* to the neonate via placenta and breast-feeding and their effectiveness in bacterial pathogenesis neutralization, which could protect infants against respiratory infections caused by *Bordetella pertussis*.

Descriptors: Passive immunization, breast-feeding, mice, immunoglobulin G, secretory immunoglobulin A, *Bordetella pertussis*.

1. INTRODUÇÃO

A coqueluche, popularmente conhecida como tosse comprida é uma doença respiratória grave, altamente transmissível, causada por um cocobacilo Gram-negativo aeróbio denominado *Bordetella pertussis*. É um patógeno encapsulado, estritamente humano, sem reservatório animal ou ambiental conhecido. A transmissão da doença ocorre através de gotículas respiratórias (Cherry e Heininger, 2004).

Os fatores de virulência associados a *B. pertussis* são tipicamente divididos em três categorias: adesinas, toxinas e lipopolissacarídeos (LPS). Entre as adesinas estão descritos os filamentos de hemaglutinina (FHA), fímbrias (FIM) e aglutinógenos sorotipo-específicos (AGG), estes últimos, presentes como componentes imunogênicos de superfície, sendo os principais, AGG1, 2 e 3. Já o grupo das toxinas, é constituído pelas toxinas pertussis (PT), adenil ciclase (CyaA), dermonecrótica (DNT) e citotoxina traqueal (TCT) (Mattoo e Cherry, 2005).

Também estão presentes as proteínas autotransportadoras, que podem atuar como proteases, adesinas, toxinas, invasinas e lipases e tem a propriedade de se autoexportarem para a membrana externa da bactéria e permanecerem não covalentemente associadas à superfície bacteriana ou serem liberadas para o ambiente extracelular (Henderson e Nataro, 2001). Estão descritas a pertactina (PRN), fator de colonização traqueal (TcfA), Vag8, BrkA, SphB1.

No soro, a concentração de anticorpos específicos para os antígenos da vacina pode ser uma indicação de resposta imune à doença, porém, o nível protetor de anticorpos séricos ainda não está definido (Healy et al., 2004). Dentre os fatores de virulência descritos acima, os principais que induzem à produção de elevados níveis de anticorpos são os FHA, PRN e PT (Mattoo e Cherry, 2005) e, por esse motivo, estão presentes na vacina de célula total ou vacina celular (DTPw) e na vacina acelular (DTPa). A vacina DTPw é constituída pelos toxóides diftérico e tetânico e suspensão de células inteiras mortas de *Bordetella pertussis*. Já a vacina DTPa é composta pelos toxóides diftérico, tetânico e alguns antígenos da *B. pertussis*, entre eles: FHA, PRN, PT e, algumas vezes, pode conter FIM, estruturas filamentosas presentes na superfície celular bacteriana, necessárias para uma colonização traqueal persistente (Mattoo e Cherry, 2005).

FHA, proteínas de superfície de 220 kDa, são referidas constantemente como a principal adesina, auxiliando na adesão bacteriana à superfície da célula hospedeira. Além disso, são altamente imunogênicas e promovem forte resposta de anticorpos, tanto sistêmica, quanto de mucosas (Locht, 1999; Heininger, 2001).

A PRN é uma proteína autotransportada, expressa na membrana externa, com peso molecular de 68 a 70 kDa. Dados mostram que anticorpos anti-PRN persistem por mais tempo que anticorpos para outros antígenos da bactéria, induzindo aumento da imunidade protetora. A PRN

também é responsável pela aderência na parede da célula hospedeira (Henderson e Nataro, 2001).

A PT é uma toxina com peso molecular de 105 kDa, sintetizada e secretada exclusivamente pela *B. pertussis*, composta por duas principais subunidades: uma subunidade A, enzimaticamente ativa de 26 kDa, e uma subunidade B pentamérica de 79 kDa, a qual se liga aos receptores específicos em células alvo. A PT incorpora-se à célula alvo e ativa sua produção de AMPc, uma molécula que atua como segundo mensageiro na regulação da síntese de proteínas (Weiss et al., 1993). Além disso, induz à produção de elevados níveis de anticorpos séricos, por isso tem sido considerada como um componente fundamental nas vacinas acelulares, apresentando-se também como um forte adjuvante (Locht, 1999; Heininger, 2001). É comumente citada como o principal fator de virulência expresso pela *B. pertussis*, responsável por muitos, senão todos, os sintomas tipicamente associados à coqueluche, bem como a linfocitose (Pittman, 1984).

Vários fatores de virulência têm sido implicados na adesão bacteriana ao epitélio, e por interagirem entre si de forma sinérgica, a designação de uma única proteína como adesina primária se torna difícil (Weiss e Hewlett, 1986). A infecção por *B. pertussis* se inicia pela adesão dos FHA, FIM e PRN nos cílios das células epiteliais do trato respiratório superior. Além delas, a PT também auxilia na adesão bacteriana, pois enquanto sua subunidade A permanece vinculada à bactéria, sua subunidade B se liga aos glicolipídeos presentes nos cílios das células epiteliais brônquicas. Além

disso, quando a bactéria é fagocitada, a PT inibe a fusão do fagolisossomo e impede que as enzimas lisossomais degradem a bactéria, e dessa forma, a indução da migração de linfócitos e macrófagos para as áreas de infecção é inibida.

Vários estudos mostraram que *B. pertussis* tem uma fase intracelular, onde a CyaA entra em neutrófilos e catalisa a produção excessiva de AMPc, que irá intoxicar as células e comprometer sua fagocitose. As toxinas DNT e CyaA e, mais especificamente, a TCT provocam danos teciduais locais nas células epiteliais ciliadas e são responsáveis pela tosse paroxística característica da infecção por *B. pertussis* (Mattoo et al., 2001; Mattoo e Cherry, 2005).

Em dois estudos compostos por uma coorte de indivíduos vacinados foi demonstrado que a PRN constitui o antígeno vacinal mais importante e age de modo sinérgico com a PT (Cherry et al., 1998), ao passo que anticorpos contra FHA não contribuem para a proteção (Cherry e Heininger, 2004). No entanto, em outro estudo no qual a vacina com PT foi comparada a uma vacina contendo PT e FHA verificou-se uma maior eficácia desta última vacina, sugerindo que na ausência da PRN, anticorpos anti-FHA contribuem para a proteção (Storsaeter e Olin, 1992; Storsaeter et al., 1992).

Ainda, Müller et al. (1997) observaram que o aumento da IgG anti-PT e anti-FHA são avaliados em mais de 90% das infecções, IgG anti-PRN em 30 a 60%, IgA anti-PRN em 20 a 40%, IgA anti-PT em 20 a 40% e IgA anti-FHA em 30 a 50% das pessoas infectadas.

Desde 1940, quando a vacina celular contra coqueluche foi introduzida em diversos países com subsequente substituição pela vacina acelular, houve uma diminuição significativa na incidência da enfermidade, com redução da morbidade e mortalidade. Os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que, em 2003, ocorreram cerca de 17,6 milhões de casos, 90% dos quais em países em desenvolvimento, e destes casos, em torno de 279.000 doentes evoluíram para óbito (World Health Organization, 2005). Relatos da epidemiologia da coqueluche em países desenvolvidos e em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul são limitados, mas a OMS estima que esses países apresentem maior porcentagem da doença (Crowcroft et al., 2003).

Por outro lado, diversos estudos tem relatado um aumento drástico dos casos de coqueluche em todas as faixas etárias, incluindo em adolescentes e adultos, entre as décadas de 80 e 90 (Andrews et al., 1997; de Melker et al., 2000), e atualmente, isso representa um crescente problema de saúde pública para os países desenvolvidos incluindo Estados Unidos, França, Canadá e Austrália (Güris et al., 1999; National Center for Immunisation Research, Surveillance of Vaccine Preventable Diseases, 2002; Ntezayabo et al., 2003; Greenberg, 2005). Além disso, a gravidade da doença em lactentes tem sido relatada nos últimos anos: como em nove casos relatados no Reino Unido por Smith e Vyas (2000), dos quais seis foram a óbito. Embora a infecção seja significativa em termos de custos médicos, a consequência mais inquietante é epidemiológica.

A Figura 1 mostra claramente o aumento da incidência de casos de coqueluche a partir da década de 80 em vários países desenvolvidos, bem como na Argentina.

Figura 1: Número de casos relatados de coqueluche na Argentina, Japão, Holanda, Austrália, Noruega e Estados Unidos entre os anos de 1980 e 2008. Adaptado de: http://www.who.int/immunization_monitoring/en/globalsummary/timeseries/tsincidenceper.htm.

No Brasil, com base nos dados de notificação compulsória, não existem, ainda, sinais de re-emergência da doença. A dinâmica observada é a de diminuição do número de casos notificados em resposta ao aumento da cobertura vacinal (Figura 2) (Luz et al., 2003). Vale ressaltar que esta estabilidade no número de casos no país pode estar ocorrendo de fato, ou pode existir uma baixa notificação de novos casos ao Ministério da Saúde.

Figura 2: Coeficiente de incidência da coqueluche e cobertura vacinal pela DTP no Brasil entre os anos de 1980 e 2003. *Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica, 2005b.*

Em trabalho realizado em 7 municípios do Estado de São Paulo foi observado um aumento da notificação de casos suspeitos de coqueluche, entre os anos de 2004 e 2005, revelando um coeficiente de incidência de 5,86, para um total de 818.872 habitantes. Em 2004 foram confirmados 27 casos e, apenas no primeiro trimestre de 2005, mais 21 novos casos, totalizando 48 casos de coqueluche. Os mais acometidos foram lactentes menores de 1 ano (30 casos), sendo 50% menores de 2 meses de idade (Pellini et al., 2005). No entanto, estes dados correspondem à incidência de uma pequena região do Estado de São Paulo, pois ainda não temos dados disponíveis de todo o território nacional.

Fazer uma comparação da incidência da coqueluche entre países é uma tarefa difícil devido a diferenças na definição de caso, acesso a testes diagnósticos, relato clínico e práticas de notificação. Diferentes estratégias de imunização e níveis históricos de cobertura de imunização dentro e entre os países também afetam a epidemiologia da coqueluche (Wood e McIntyre, 2008).

Assim, a coqueluche vem se tornando endêmica em populações altamente vacinadas como na Austrália, Canadá, Europa, Japão e Estados Unidos, com aumento da incidência a cada 3 ou 5 anos. Nessas populações, a transmissão direta entre crianças antes de a vacinação ser introduzida, tem sido substituída pela transmissão por adolescentes e adultos (Crowcroft et al., 2003; Caro et al., 2007; Vitek et al., 2003; Mikelova et al., 2003). Adultos, particularmente os familiares, são as principais fontes de infecção (Forsyth et al., 2005; Altunaiji et al., 2007; Elliot et al., 2004; Baron et al., 1998). Em estudo multicêntrico realizado em países da Ásia, Europa e da América Latina, aproximadamente 75% dos lactentes hospitalizados não receberam ou receberam uma única dose da vacina contra a coqueluche (Kowalzik et al., 2007) e na Austrália, metade de todas as hospitalizações decorrentes da coqueluche entre os anos de 1994 e 2004 ocorreu em lactentes com menos de 12 semanas de vida, que receberam uma única dose da vacina na oitava semana de vida (Wood et al., 2008).

Uma possível explicação é que adultos e adolescentes infectados, provavelmente em decorrência da diminuição da imunidade, tanto induzida pela vacina, como após a doença, ajam como reservatório de infecção e

transmissão para crianças não vacinadas ou parcialmente vacinadas (Tan et al., 2005). No Brasil, um estudo de transmissão doméstica mostrou que 75% dos lactentes abaixo dos 6 meses de idade foram infectados por pessoas com mais de 11 anos (Baptista et al., 2005).

Diversas hipóteses têm sido sugeridas para explicar a re-emergência da coqueluche nos países desenvolvidos. A diminuição da imunidade é citada em alguns estudos indicando que a duração da imunidade após a vacinação diminui aproximadamente entre 4 e 12 anos em crianças e, a diminuição da proteção após a infecção entre 7 e 20 anos (Cherry, 2005; Cherry et al., 2005; Wendelboe et al., 2005; Wheeler e Simmons, 2005). Torvaldsen e McIntyre (2003) viram que a incorporação de uma quinta dose da vacina contra coqueluche na Austrália reduziu a incidência da enfermidade em crianças entre 5 e 10 anos de idade, aumentando naquelas entre 12 e 14 anos. Esse deslocamento da faixa etária constitui um claro indício da falta de aquisição de imunidade duradoura.

Outras hipóteses sugeridas para a re-emergência da coqueluche são a redução da eficácia vacinal, como ocorreu no Canadá, onde foi observada uma baixa eficácia vacinal de lotes de vacinas utilizados no passado (Ntezayabo et al., 2003) e melhoria dos sistemas de vigilância epidemiológica devido a uma maior capacidade de detecção por métodos diagnósticos mais eficientes. A evolução do patógeno também foi sugerida, como mostra os estudos realizados na Holanda e Finlândia, onde *Bordetella pertussis* adaptou-se para expressar moléculas de PT e PRN distintas das presentes na vacina, com consequente redução da efetividade vacinal

(Godfroid et al., 2005; He et al., 2003; Center for Disease Control and Prevention, 2005). Um estudo mais recente realizado na Finlândia reportou que a bactéria tem mostrado mudanças conformacionais em uma região da PRN, sugerindo que a redução da imunidade induzida pela vacina devido a essa alteração pode levar ao aumento do número de casos de infecção (Heikkinen et al., 2007).

Apesar de, no Brasil, a primeira geração da vacina contra coqueluche ter sido introduzida em 1926, somente em 1977, após a criação do Programa Nacional de Imunizações, é que a vacina foi definida como obrigatória para menores de 1 ano de idade (Portaria Ministerial nº 452, de 6/12). A cobertura vacinal variou de 37% em 1980 para 100% em 2000 e o índice de casos foi diminuindo gradativamente: de 15,3 mil casos em 1990 para 1,2 mil casos em 2000. Em 2002, implantou-se a vacina combinada DTP+Hib (contra difteria, tétano, coqueluche e *Haemophilus influenzae* tipo b) para menores de 1 ano de idade em início de esquema, alcançando 64% de meta de vacinação nessa idade e em 2003 a cobertura vacinal alcançou quase 100% da população (Brasil, Ministério da Saúde, 2003). Hoje, o Ministério da Saúde preconiza a vacinação contra coqueluche aos 2, 4 e 6 meses com DTP+Hib, e reforço aos 15 meses e entre 4 e 6 anos de idade com a DTPw.

O Ministério da Saúde define um caso como suspeito de coqueluche quando um indivíduo, independente da idade e estado vacinal, apresente tosse seca há 14 dias ou mais, associada a um ou mais dos seguintes sintomas: tosse paroxística (tosse súbita incontrolável, com tossidas rápidas

e curtas, entre 5 e 10, em uma única expiração); guincho inspiratório; vômitos pós-tosse; ou história de contato com um caso confirmado de coqueluche pelo critério clínico. O caso de coqueluche é considerado confirmado pelo critério laboratorial quando se obtém isolamento de *B. pertussis*, ou pelo critério epidemiológico, quando o caso suspeito teve contato com caso confirmado pelo critério laboratorial, entre o início do período catarral até 3 semanas após o início do período paroxístico da doença (período de transmissibilidade) (Brasil, Ministério da Saúde, 2005a).

Os testes laboratoriais, incluindo cultura, sorologia e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresentam variação da sensibilidade e especificidade (Wood e McIntyre, 2008). Durante 15 anos, o método de ELISA (ensaio imunoenzimático) tem constituído a principal técnica utilizada no diagnóstico sorológico usando antígenos específicos para *B. pertussis*, no qual um caso é indicado como suspeito quando há aumento dos títulos de IgA ou IgG anti-PT, FHA, PRN, FIM ou bactéria total em duas amostras de soro coletadas entre um período de 2 a 4 semanas (Mattoo e Cherry, 2005). Recentemente, a PCR tem permitido uma identificação mais eficiente de novos casos, levando a maiores taxas de notificação da coqueluche nos países desenvolvidos (Wood e McIntyre, 2008). A OMS considera a cultura bacteriana o padrão-ouro para a confirmação laboratorial (Pellini et al., 2005).

Lactentes com 6 meses de idade ou menos que não receberam o esquema básico de vacinação ainda são o grupo mais susceptível (Figura 3) e, quando infectados, a doença pode apresentar sintomatologia atípica,

porém grave quando comparada a observada em crianças mais velhas (Smith e Vyas, 2000). Um estudo epidemiológico que analisou dados da OMS de países desenvolvidos e em desenvolvimento demonstrou que, entre 142 lactentes menores de 5 meses de idade, hospitalizados com quadro de insuficiência respiratória grave, 23% tinham coqueluche, alertando-se para a gravidade da infecção nessa faixa etária e para a elevada frequência com que a enfermidade não é diagnosticada (Crowcroft et al., 2003).

Figura 3: Número de casos de coqueluche, por grupo de idade, no Brasil, entre os anos de 1992 e 2003. *Fonte. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica, 2005b.*

A maior suscetibilidade à infecção por *B. pertussis* observada em crianças, particularmente nos primeiros 4 meses de vida, momento em que o esquema completo de vacinação ainda não foi recebido, sugere uma falta de

anticorpos adquiridos passivamente através da placenta e pelo aleitamento materno (Center for Disease Control and Prevention, 2002).

Ao nascimento, o bebê apresenta uma imaturidade do seu sistema imune, que levará algum tempo para se desenvolver e, portanto, a passagem transplacentária e o aleitamento materno proverão ao neonato uma imediata proteção.

Muitas substâncias são transferidas ativa ou passivamente através da placenta, dependendo de seu peso molecular, solubilidade lipídica, polaridade e ionização (Thorton e Vance, 2002).

Com relação a imunoglobulinas, sabemos que das cinco classes de anticorpos (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) a única capaz de ser transportada através da barreira transplacentária é a IgG (160 kDa) e sua taxa de transmissão varia de acordo com a subclasse a que pertence. Malek et al. (1996) estudando essas subclasses, verificaram que a passagem transplacentária ocorre de acordo com a habilidade das imunoglobulinas em transpor a interface materno-fetal sendo maior para IgG1>IgG4>IgG3>IgG2, mas outros autores acreditam que IgG1 e IgG3 possuem maior eficiência, seguidas de IgG4 e IgG2 (de Moraes-Pinto et al., 2001). Outros estudos indicam que os níveis de IgG1 no recém-nascido, logo após o nascimento, geralmente excedem os maternos, os da IgG2 geralmente são mais baixos, os da IgG3 são iguais aos níveis maternos e os da IgG4 são mais variáveis, porém geralmente se igualam aos maternos (Simister et al., 1996; Simister, 2003).

As primeiras evidências de passagem transplacentária de imunoglobulinas surgiram com Brambell et al. há aproximadamente sessenta anos (Brambell et al., 1949) e diversos candidatos ao receptor Fc responsável pelo transporte de IgG já foram estudados (Kristoffersen et al., 1990). Baseados na observação de que moléculas de IgG total ou fragmentos Fc de IgG passam pela circulação fetal mais facilmente que fragmento $F(ab')^2$ foi hipotetizado que o receptor Fc de IgG (Fc R) em células da placenta poderia estar envolvido no mecanismo responsável por transferir anticorpos IgG específicos. No entanto, estudos demonstraram que o responsável pelo transporte da IgG materna através da placenta para os capilares fetais é o receptor neonatal para porção Fc (FcRn). Este receptor é uma proteína formada por duas cadeias polipeptídicas homólogas as da molécula do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC-I), constituído por uma cadeia pesada α e uma cadeia leve, a 2-microglobulina (Kristoffersen e Matre, 1996; Simister et al., 1996).

No entanto, o conhecimento atual acerca do transporte transplacentário de IgG em nível molecular no ser humano é ainda incompleto. As evidências mostram um papel do FcRn no transporte materno de IgG através do sinciciotrofoblasto, porém, como esse receptor não parece estar presente no endotélio do capilar fetal, o modo como a molécula de IgG atinge a circulação fetal é assunto ainda desconhecido.

O transporte da IgG materna através da placenta humana é um processo denominado transcitose e ocorre da seguinte forma: o sinciciotrofoblasto internaliza fluido materno contendo moléculas de IgG

formando um endossomo, onde estão presentes os receptores FcRn. Este endossomo é então gradualmente acidificado permitindo a ligação do receptor a IgG materna. Protegidas da ação de enzimas lisossomais, as moléculas de IgG acopladas aos receptores são então transportadas até a lâmina basal trofoblástica que, em pH fisiológico, se dissociam. Uma vez na matriz extracelular, ganham acesso ao endotélio fetal e, assim, à circulação fetal. Sabe-se que nem toda IgG materna atinge a circulação fetal: as moléculas que não se ligam aos receptores nas vesículas transportadoras são digeridas pelas enzimas lisossomais (Roopenian e Akilesh, 2007).

O transporte de IgG através da placenta no ser humano se inicia por volta da vigésima semana de gestação, se acentua após o início do terceiro trimestre, aumentando progressivamente até o termo (Simister, 2003; Simister et al., 1996). Em estudo realizado por Healy et al. (2004), com 64 amostras de soro materno, de cordão umbilical e dos respectivos recém-nascidos, obtidas 2 meses após o parto, foi demonstrada uma eficiente passagem transplacentária de anticorpos anti-PT, FHA e FIM, porém os níveis de anticorpos aos dois meses de idade decaíram para um terço da concentração observada ao nascimento.

Outra forma de conferir proteção é através da amamentação, a qual fornece passivamente ao lactente anticorpos IgA protetores. Particularmente, esse processo se torna indispensável aos recém-nascidos prematuros que, como citado acima, podem ser deficientes de anticorpos IgG maternos.

Extensos estudos epidemiológicos têm demonstrado que a amamentação é um eficiente processo de proteção para a criança contra

doenças infecciosas, apresentando uma capacidade significativa de diminuir a taxa de mortalidade infantil, além de reduzir o risco de diarreias agudas e persistentes, sepse neonatal, doenças respiratórias, entre outros benefícios (Hanson e Telemo, 1999). Além disso, produz também efeitos em longo prazo, diminuindo a incidência de infecções, alergias e outras entidades patológicas (Lemke et al., 2004).

As superfícies mucosas são uma fronteira entre o meio interno e ambiente externo, o que representa uma porta de entrada para a maioria das infecções no ser humano. Por isso, as superfícies mucosas contam com um sistema de proteção anti-infecciosa muito eficiente, onde atuam mecanismos inespecíficos como movimento peristáltico, transporte mucociliar e enzimas, e mecanismos adaptativos representados principalmente pelo sistema imune de mucosas (MALT, *Mucosal associated lymphoid tissue*). Este é constituído por células imunocompetentes que infiltram as mucosas, nódulos linfóides que formam as estruturas tipo placas de Peyer na mucosa intestinal e seus equivalentes na mucosa brônquica, além de linfonodos regionais, tais como os mesentéricos. O MALT é povoado por células de diversas subpopulações, com variadas funções, inclusive a de produzir anticorpos secretores, com predominância absoluta de IgA secretória (SIgA), que, atravessando o epitélio, vai se incorporar ao muco que recobre todas as superfícies mucosas do organismo (Brandtzaeg, 1995).

O sistema imune comum de mucosas no recém-nascido, no entanto, ainda não se encontra amadurecido, as placas de Peyer contêm apenas centros germinativos primários, as células B da submucosa produzem

apenas IgM, há poucas células T e praticamente não se encontram células de memória. No trato gastrointestinal, em particular, a imaturidade do epitélio permite uma maior permeabilidade para macromoléculas e propicia maior adesão de microrganismos. A baixa acidez gástrica e menor atividade de enzimas digestivas ainda não representam uma barreira tão eficiente comparado ao organismo adulto (Bernt e Walker, 1999).

O colostro e o leite humano apresentam diversos fatores anti-infecciosos específicos e inespecíficos. São encontrados fatores bioquímicos com ação anti-infecciosa como enzimas, citocinas, componentes do sistema complemento, oligossacarídeos, nucleotídeos, lipídeos e hormônios, que interagem entre si e com as mucosas do trato digestivo e respiratório do recém-nascido conferindo, além da imunidade passiva, estímulo ao desenvolvimento e maturação do sistema imunológico do neonato (Carbonare e Carneiro-Sampaio, 2006; Grumach et al., 1993).

O colostro é a primeira linha de defesa do neonato, capaz de estimular seu sistema imunológico. Ele é definido como a secreção mamária coletada nos primeiros 2 a 3 dias de lactação ou até uma semana após o parto (Islam et al., 2006).

A IgA secretória está presente em maior abundância no colostro e está envolvida na proteção dos recém-nascidos contra patógenos ou toxinas (Takahashi et al., 2002). Esses anticorpos são dirigidos a inúmeros patógenos ou toxinas com os quais a mãe entrou em contato durante toda a vida, representando, de certa forma, uma “memória” do seu repertório imunológico, como foi demonstrado para *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*,

Campylobacter, *Shigella*, *Giardia lamblia* e outros agentes infecciosos (Hanson, 1998; Takahashi et al., 2002). Sua função é agir localmente, promovendo a inibição da aderência de patógenos nas superfícies mucosas da criança.

A IgA apresenta uma estrutura peculiar, extremamente adaptada para agir nas condições das superfícies mucosas: é geralmente polimérica (dimérica ou trimérica), ligada a uma cadeia J (sintetizada pelos plasmócitos) e contém um componente secretor (produzido pela célula epitelial), constituindo um complexo com alta avidéz para ligação com antígenos e maior resistência à ação de enzimas proteolíticas, abundantes nas secreções mucosas (Brandtzaeg, 1995; Russel et al., 1999). Anticorpos da classe IgA são produzidos por plasmócitos presentes na lamina própria subjacente ao epitélio e liberados geralmente como dímeros ligados à cadeia J nas proximidades da porção basolateral das células epiteliais, onde estão presentes receptores específicos para imunoglobulina polimérica. Estes receptores são glicoproteínas de cerca de 100 kDa, pertencentes à superfamília de imunoglobulinas, e são expressos constitutivamente na membrana basolateral das células epiteliais secretórias (Brandtzaeg, 1995).

Os dímeros de IgA, ao se ligarem aos receptores, inicia-se um processo de internalização por endocitose. Assim, a IgA é transportada até a porção apical da célula epitelial, onde ocorre uma clivagem do receptor e um pequeno fragmento C-terminal transmembrânico que permanece na célula epitelial é degradado, enquanto a porção maior extracelular é incorporada ao complexo IgA-cadeia J como componente secretor. Este mecanismo de

secreção de IgA ocorre nas superfícies da mucosa oral, intestinal, brônquica, assim como na glândula mamária durante a lactação.

Anticorpos IgM são a segunda imunoglobulina mais abundante no colostro humano, em concentrações de até 2,5 mg/ml. Anticorpos IgM de alta avidéz reativos com vírus e bactérias podem ter um importante papel na defesa das superfícies mucosas do lactente. A IgG encontra-se em baixas concentrações no leite humano, cerca de 0,1 mg/ml, tem atividade opsonizante podendo ativar o complemento e a citotoxicidade dependente de anticorpos, o que é uma atividade pouco presente nas superfícies mucosas do lactente.

Sugere-se, ainda, que o leite humano possa conferir proteção contra outras infecções e doenças, como infecções respiratórias e do trato urinário, enterocolite necrotizante, doenças atópicas, diabetes tipo 1, esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença celíaca e doença de Crohn, porém, existem trabalhos controversos a este respeito (Hanson, 1998; Hanson e Telemo, 1999). Embora ainda existam dados controversos sobre o efeito do leite humano em doenças auto-imunes, os efeitos benéficos do leite materno para um ótimo crescimento, desenvolvimento e proteção contra agentes infecciosos são razões suficientes para se estimular o aleitamento, contribuindo assim para a melhoria das condições de saúde das crianças.

Elahi et al. (2006) demonstraram que a imunização realizada durante a gestação em porcas aumentou significativamente os níveis de anticorpos IgG e IgA específicos para *B. pertussis* em soro e colostro materno, e estes anticorpos foram transmitidos eficientemente aos seus filhotes, através da

análise no fluido do lavado broncoalveolar. Também foi observada, após amamentação, uma maior proteção conferida aos seus filhotes após desafio intrapulmonar com *B. pertussis*, demonstrando a importância dos anticorpos IgG e IgA passivamente adquiridos pelo colostro contra a bactéria. Estudos *in vivo* com modelos animais possibilitam a associação entre testes sorológicos que dosam níveis de anticorpos específicos e sua capacidade de proteger contra a doença.

Há mais de 60 anos, o trabalho realizado por Cohen e Scadron (1943) demonstrou que a maioria dos recém-nascidos das gestantes imunizadas com *B. pertussis* apresentou títulos de anticorpos aglutinantes iguais ou maiores aos de suas mães, e mostrou também a capacidade protetora desses anticorpos em testes *in vivo* com camundongos. No entanto, este estudo foi realizado há muitos anos, e o perfil epidemiológico deste microrganismo se modificou ao longo do tempo com a introdução dos programas de imunização.

Uma vez que trabalhos realizados em outros países demonstraram baixos níveis de anticorpos anti-*B. pertussis* aos dois meses de vida adquiridos por eficiente passagem transplacentária, no entanto, não investigaram o importante papel protetor do colostro humano durante o período em que o lactente ainda não recebeu o esquema completo de imunização, torna-se de extrema relevância estudar a presença de anticorpos reativos com *Bordetella pertussis* na população de puérperas saudáveis brasileiras e a transmissão destes anticorpos para os seus recém-nascidos. Além disso, a avaliação da capacidade neutralizante destes

anticorpos em testes *in vivo*, possibilitaria a investigação de seu efeito na proteção contra infecções por *B. pertussis*, complementando, assim, a avaliação da transferência de imunidade materno-infantil.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Avaliar a transmissão passiva para o recém-nascido de anticorpos IgG séricos e IgA secretores reativos com *Bordetella pertussis* através da passagem transplacentária e do aleitamento materno, respectivamente.

2.2 Avaliar a atividade funcional dos anticorpos IgG séricos e IgA secretores específicos em modelo experimental com camundongos desafiados por via intracerebral com *Bordetella pertussis* viável.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram obtidas 40 amostras de soro e colostro de mulheres clinicamente saudáveis e soro de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos, selecionados na Maternidade do Hospital Universitário entre os meses de junho e dezembro de 2007, de acordo com os seguintes critérios:

- Critérios de inclusão: idade das mães entre 18 e 35 anos; ausência de quadros de diabetes e (ou) hipertensão; recém-nascido sadio com idade gestacional entre 37 e 41 6/7 semanas e com peso adequado para idade gestacional.

- Critérios de exclusão: doenças crônicas, o uso de qualquer tipo de medicação, doenças infecciosas graves durante a gestação ou no período do parto, reações sorológicas positivas ou reagentes para HIV, HTLV I/II, sífilis e hepatites B e C.

Após a dequitação da placenta, as amostras de sangue de cordão umbilical, foram coletadas em tubos contendo gel separador (BD Vacutainer SST), centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos a 20°C e os soros aliquotados e armazenados a -20°C. O mesmo foi feito com as amostras de sangue das mães colhidas após o parto.

As amostras de colostro foram coletadas por ordenha manual, nas primeiras 72 horas após o parto. 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 a -20°C.

Foram utilizados dois *Pools* controle nos testes realizados: um *Pool* de Soro Humano Controle, constituído por 10 amostras de soro de adultos doadores de sangue saudáveis, dos sexos masculino e feminino e com resultados negativos nos testes sorológicos convencionais e um *Pool* de Colostro Humano Controle, constituído por 32 amostras de colostro de parturientes clinicamente saudáveis, ambos já disponíveis no laboratório.

3.2 Ética

Estes procedimentos foram realizados após aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPEsq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Comitê de Ética do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Apêndice 1) e a assinatura de um termo de consentimento pré-esclarecido, onde todas as parturientes estiveram inteiramente de acordo em participar deste estudo.

3.3 Linhagens bacterianas

Para os ensaios *in vitro* foi utilizada suspensão da cepa 137 de *Bordetella pertussis* inativada (NIH, Bethesda, MD, USA) na concentração de $2,6 \times 10^{11}$ bactérias/ml, lote: IB-CIIIn/P 21/07, preparada na Seção de Vacinas Aeróbias do Instituto Butantan, que foi gentilmente cedida pela Dra.

Hisako Gondo Higashi, diretora da Divisão Bioindustrial. A suspensão foi mantida a 4°C.

Para ensaios *in vivo* foi utilizada suspensão de *Bordetella pertussis*, linhagem 18323 (NIH, Bethesda, MD, USA), obtida por crescimento a 35°C em ágar Bordet-Gengou suplementado com sangue de carneiro desfibrinado a 15% por 48 horas. Após mais dois novos repiques de 18 horas, o crescimento bacteriano foi ressuspenso em glicerol a 10%, em solução de ácido casamínico e soro fetal bovino, até a concentração de 10 unidades opacimétricas por ml (UOp/ml) e congelado em nitrogênio líquido para uso posterior no teste de inoculação intracerebral em camundongos.

A cepa 137 é utilizada na preparação da vacina com células inteiras empregada no Brasil e a linhagem 18323 é denominada como cepa selvagem. Ambas produzem todos os fatores de virulência reconhecidamente envolvidos na patogenidade desta bactéria, entre eles, a toxina pertussis, aglutinógenos 1, 2 e 3, fímbrias, pertactina e filamentos de hemaglutinina.

3.4 Preparo dos *Pools* das amostras

De acordo com os títulos de anticorpos IgG e IgA anti-*B. pertussis* obtidos nos testes de ELISA, foram preparados *Pools* Teste de Soro materno e de Soro de cordão umbilical com titulação alta e com titulação baixa de anticorpos IgG anti-*B. pertussis*, formados com 5 amostras de soro cada. Também foram preparados dois *Pools* Teste de Colostro, um com título médio e outro com título baixo de anticorpos IgA anti-*B. pertussis*,

formados com 7 amostras de colostro cada. Todos os 6 *Pools* foram preparados com 0,5 ml de cada amostra, homogeneizados, aliquotados e armazenados a -20°C. Para o controle de especificidade do teste intracerebral em camundongos, também foi utilizada uma solução de imunoglobulina G humana (Octagam®, Vienna, Austria), empregada em terapia com imunoglobulina intravenosa que contém, pelo menos, 95% de IgG humana e somente traços de IgM e IgA.

3.5 Absorção dos *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle com *B. pertussis* inativada

Com o intuito de retirar anticorpos específicos para a bactéria, alíquotas dos *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle foram absorvidas com a mesma suspensão de bactérias utilizada para os testes *in vitro*.

A suspensão inativada de *B. pertussis* (10 ml) foi centrifugada a 3.000 rpm por 25 minutos a 20°C para realizar, posteriormente, a absorção do *Pool* de Soro Humano Controle e o mesmo procedimento foi efetuado para a absorção do *Pool* de Colostro Humano Controle. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* contendo as bactérias foram pesados. Alíquotas dos *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle foram diluídas 1:2 e adicionadas aos tubos contendo o sedimento bacteriano, separadamente, na proporção de 1 g de bactérias para 1 ml de *Pool* de soro ou de colostro e incubadas por duas horas a 37°C.

Os materiais foram mantidos em repouso por 16 a 18 horas a 4°C e posteriormente centrifugados a 15.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Este

procedimento foi realizado duas vezes na tentativa de retirar todos os anticorpos anti-*B. pertussis* dos *Pools* de soro e colostro. Os sobrenadantes foram colhidos e estocados a -20°C até o momento do uso no ELISA e no desafio intracerebral em camundongos.

3.6 Dosagem de anticorpos totais

3.6.1 Dosagem de IgG total por Imunodifusão Radial Quantitativa (IDRQ)

A técnica de IDRQ (Mancini et al., 1965) consiste no preparo de agarose a 1% em PBS 7,4 mantida em banho a 56°C até a estabilização da temperatura. Para dosagem de anticorpos IgG totais, para cada 6 ml de agarose, são colocados 70 µl de anti-IgG humano desenvolvidos em carneiro (I-1011, Sigma, St. Louis, MO, USA). A mistura foi colocada em um tubo de ensaio mantido no banho a 36°C e homogeneizado cuidadosamente por inversão e, rapidamente colocou-se entre as placas previamente montadas permanecendo por 1 hora a temperatura ambiente e em seguida a 4°C por 2 horas. Foi feita a demarcação dos orifícios para adição do soro padrão, das amostras controle e amostras teste previamente diluídos. Para a dosagem de IgG total foi utilizado soro padrão Beckman Coulter® (Chaska, MN, USA) nas concentrações de 2.385 a 37,26 mg/dl, para a obtenção da curva padrão. Duas amostras controle de soro, com concentrações de IgG já conhecidas foram utilizadas, diluídas em 1:40. As demais amostras a serem testadas foram diluídas em 1:20 e 1:40 (soro materno) e 1:20 (soro de

cordão umbilical) em PBS pH 7,4. Foram aplicados 5 µl por halo de cada amostra.

As placas foram incubadas em câmara úmida por 48 horas a 4°C. Após esse período, os diâmetros dos halos de precipitação foram medidos e um gráfico com a curva padrão foi montado. O valor da concentração de IgG de cada amostra foi calculado por interpolação com a curva padrão. Os valores obtidos das concentrações das amostras no gráfico foram multiplicados pelos valores de suas respectivas diluições para a obtenção do valor real da concentração de IgG nas amostras de soro. Os resultados finais foram calculados no programa GraphPad Prism 5.0 (USA) e expressos em mg/dl.

3.6.2 Dosagem de IgA total pelo método de ELISA

A IgA total do colostro foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme o método descrito por Nagao et al. (1990). Microplacas de 96 orifícios (3590, Corning, NY, USA) foram revestidas com 100 µl/orifício de 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 de 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 Coloostro Humano Controle. Após as lavagens e posterior incubação do conjugado anti-IgA humano marcado com peroxidase (A-0295, γ -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 de 492 nm (Labsystems, Finland). Utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.0 (USA) para calcular os valores de cada teste. As concentrações de IgA total das amostras de colostro foram determinadas a partir dos valores da curva padrão de IgA de colostro e expressas em g/l.

3.7 Dosagem de anticorpos específicos

3.7.1 Titulação de anticorpos IgG e IgA anti-*B. pertussis* pelo método de ELISA

Anticorpos IgG e IgA do soro materno, anticorpos IgG de soro de cordão umbilical e anticorpos IgA do colostro reativos com *B. pertussis* (bactérias inteiras) foram avaliados por ensaio imunoenzimático (ELISA), após padronização da técnica. Placas de microtitulação (3590, Corning, NY, USA) foram adsorvidas com a suspensão bacteriana na concentração de $2,6 \times 10^8$ em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0, e deixadas por 16 a 18 horas a 4°C. Cada etapa do teste foi precedida por 4 lavagens com PBS-T.

As placas foram, então, bloqueadas (PBS 7,4 - leite desnatado em pó 1%) por 1 hora e, em seguida, os *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle, absorvidos ou não, os *Pools* Teste de Soro e Colostro com alto e baixo título de anticorpos específicos, as amostras teste de soro e colostro e a solução de imunoglobulina intravenosa 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 10%, 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 90 minutos 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 de 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 títulos, determinados através da curva semilogarítima feita a partir dos resultados das D.O.s obtidas com os *Pools* controle de soro e colostro e com as amostras em função do log₂ das diluições. A partir da curva, os títulos das amostras foram determinados como a recíproca da diluição correspondente a uma D.O. de 0,5.

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A determinação da concentração protéica da suspensão bacteriana foi determinada por meio do BCA Protein Assay Kit, utilizando-se o método do ácido bicinconínico (23227, Pierce Chemical Company, USA). A suspensão bacteriana apresentou concentração protéica de 5.760 µg/ml.

Para preparação do extrato bacteriano, a cepa 137 de *Bordetella pertussis* inativada foi diluída a uma concentração final de 3 µg/µl em tampão de amostra contendo 2% de SDS e 1% de azul de bromofenol e submetida a um aquecimento a 60°C por 15 minutos, o que resultou em um extrato bacteriano sem redução das proteínas. O extrato foi estocado a -20°C até o momento do uso.

A eletroforese foi realizada em mini-gel com 12,5% de acrilamida, com pente de 10 dentes para análise dos antígenos presentes no extrato separadamente, e com pente preparativo usado na transferência para a nitrocelulose. Em ambos foram utilizados 4 µl de padrão de peso molecular Rainbow® (225 a 12 kDa) (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). A corrida foi realizada em aparelho Mini Protean II (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) com voltagem constante (100V), até a linha de frente do corante azul de bromofenol chegar ao final do gel. Os géis com 10 dentes foram corados com Coomassie blue 0,2% para observar os perfis das bandas protéicas formadas, e os géis feitos com pente preparativo, sem coloração, foram utilizados para o preparo do “sanduíche” de Immunoblotting.

3.9 Ensaio de Immunoblotting

A partir do gel descrito anteriormente, foi preparado um "sanduíche" com as placas de fibras, papéis de filtro, o gel e a membrana de nitrocelulose (Towbin et al., 1979). A corrida de transferência foi feita fixando-se a voltagem em 12 volts por 18 horas e em seguida 20 volts por 1 hora, em aparelho Mini Protean II (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA).

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com corante de Ponceau S a 0,5% por 20 minutos, e descorada com água. A nitrocelulose foi recortada em fitas de 0,4 cm e, cada uma, bloqueada com tampão TBS 0,01M - leite desnatado em pó 5%. Após 2 horas à temperatura ambiente, as fitas foram incubadas com os *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle, os *Pools* Teste de Soro e Colostro com alto e baixo título de anticorpos específicos, a amostra de colostro com alto título de anticorpos IgA específicos e a amostra de colostro da parturiente deficiente de IgA, todos diluídos a 1:50, em tampão TBS 0,01M pH 7,4 - leite desnatado em pó 5% - Tween 20 0,05%. Após incubação por 18 horas e 6 lavagens de 10 minutos com tampão de lavagem (TBS 0,01M pH 7,4 - Tween 20 0,1%), os conjugados anti-IgG ou anti-IgA humanos marcados com peroxidase (A-0170 e A-0295, Sigma, MO, USA) foram adicionados e as placas agitadas por 2 horas. As fitas foram novamente lavadas e o substrato contendo diaminobenzidina a 0,05% em TBS 0,025M pH 7,4 e H₂O₂ (2,5µl/ml) foi adicionado ao abrigo da luz. As cubas foram deixadas em repouso até a revelação das bandas e a reação interrompida com água destilada.

3.10 Avaliação da atividade funcional dos anticorpos IgG séricos e IgA secretores específicos em modelo experimental

3.10.1 Modelo experimental

O teste utilizado para a avaliação funcional dos anticorpos, realizado através de modelo experimental utilizando camundongos Swiss, é reconhecido como específico pela Organização Mundial de Saúde e atualmente empregado pelo Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan para controle da potência da vacina DTPw (Kendrick et al., 1947) produzida no Instituto (segundo descrição da Farmacopéia Brasileira). O Dr. Wagner Quintilio do setor de Serviço de Controle de Qualidade, colaborador deste estudo, foi o responsável pela realização dos testes *in vivo*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal do Instituto Butantan (Apêndice 2).

3.10.2 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss Webster* albino, com idade entre 6 a 8 semanas, machos e fêmeas, com peso entre 18 e 20 g, mantidos no biotério do Instituto Butantan.

3.10.3 Preparo da bactéria

A suspensão de bactérias foi preparada a partir da suspensão estoque de *Bordetella pertussis* linhagem 18323 (10 UOp/ml) mantida em nitrogênio líquido. Uma alíquota dessa suspensão foi retirada e diluída

1:3.000 em solução de ácido casamínico, resultando em uma concentração de 2 a 3×10^4 bactérias, equivalente a uma dose desafio contendo entre 100 e 1.000 DL_{50} (dose letal média), em volume final de 30 μ l. Essa concentração fornece uma margem segura para promover a morte de todos os camundongos inoculados (100% de morte).

3.10.4 Teste Controle Positivo

Camundongos foram inoculados com 30 μ l da solução de ácido casamínico contendo 2 a 3×10^4 bactérias, por via intracerebral.

3.10.5 Teste Controle Negativo

Camundongos foram inoculados com 30 μ l dos *Pools* de Soro ou de Colostro Humano Controle, diluídos em solução de ácido casamínico, na ausência de bactérias, por via intracerebral.

3.10.6 Teste da capacidade neutralizante de anticorpos séricos e secretores

Após o estabelecimento do modelo experimental de neutralização com os *Pools* controle, os *Pools* de soro materno com alta e baixa titulação de anticorpos IgG anti-*B. pertussis*, os *Pools* de soro de cordão umbilical com alta e baixa titulação e os *Pools* de colostro com média e baixa titulação de anticorpos IgA específicos, previamente determinadas por ELISA, foram testados. Foram utilizadas, também, duas amostras individuais de colostro:

uma com título alto de anticorpos IgA específicos e outra amostra de uma parturiente com Deficiência Seletiva de IgA.

A especificidade de neutralização bacteriana no teste intracerebral foi avaliada pela utilização de imunoglobulina G humana (Octagam®, Vienna, Austria) e pela utilização dos *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle absorvidos com *B. pertussis* já descritos anteriormente.

Para tanto, alíquotas da suspensão bacteriana na concentração de 2 a 3×10^4 bactérias foram previamente incubadas por 30 minutos a 37°C, individualmente com cada *Pool*, ou amostra a ser testada, todos utilizados na diluição final de 1:50 e inoculadas por via intracerebral (30 µl) em camundongos ($n^\circ = 10$ a 30 animais / grupo).

Em todos os testes realizados, os animais foram previamente anestesiados com 30 mg/kg de Tiopental por via intraperitoneal e, após a inoculação, observados durante um período de 14 dias, sendo que as mortes ocorridas nos 3 primeiros dias foram desconsideradas, por um eventual acidente de inoculação. Ao final do teste, os animais sobreviventes foram eutanasiados em câmara de CO₂.

3.11 Análise Estatística

No presente trabalho, foi utilizada a análise estatística descritiva, para calcular médias, medianas, desvios padrão e intervalos de confiança. A significância das diferenças entre medianas foi analisada utilizando-se o Teste de Wilcoxon para efetuar comparações de IgG e IgA total e específica para *B. pertussis* entre soro e colostro materno e soro de cordão umbilical.

O teste de Correlação de Spearman foi utilizado para analisar a relação entre duas variáveis.

As taxas de sobrevivência entre os grupos de animais foram analisadas utilizando-se o Teste Qui-quadrado.

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

As taxas de transferência de anticorpos IgG expressas em porcentagem foram definidas como a razão entre títulos de IgG no soro de cordão e títulos de IgG no soro materno multiplicados por 100.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Foram coletados 40 conjuntos de amostras de sangue materno, de cordão umbilical e de colostro. A idade das mães variou entre 18 e 41 anos, sendo a média da idade, 26,9 anos. A idade gestacional dos recém-nascidos variou entre $37 \frac{2}{7}$ e $41 \frac{3}{7}$ semanas, com média de $39 \frac{1}{7}$ semanas. A maioria dos recém-nascidos apresentou, ao nascimento, peso adequado para idade gestacional (média de 3.325,95 g) (Anexo 1). A análise estatística descritiva não revelou diferenças significativas entre a idade das mães, idade gestacional e peso do recém-nascido.

4.1 Concentrações de anticorpos IgG totais

A mediana das concentrações de anticorpos IgG totais nas amostras de soro materno ($688,5 \pm 304,7$ mg/dl) foi significativamente menor quando comparada a de seus respectivos recém-nascidos (RNs) ($954,4 \pm 351,7$ mg/dl) ($p < 0,00001$). Foi detectada correlação entre as amostras de soro materno e de seus respectivos RNs ($r = 0,6$; $p < 0,001$). A mediana da taxa de transferência de anticorpos IgG séricos totais para os recém-nascidos foi de 129% (Tabela 1, Figura 1, Anexo 2). Foi observada correlação inversa entre as concentrações de IgG total materna e taxas de transferência ($r = -0,5$; $p < 0,01$).

TABELA 1. Análise estatística descritiva das concentrações de IgG total (mg/dl) em 40 amostras de soro materno e de soro de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos e das taxas de transferência de IgG (%)

IgG Sérica Total (mg/dl)			
	M	RN	T (%)
Média	768,0	1.001,0	138
Mediana	688,5	954,4	129
DP	304,7	351,7	43
Valor mínimo	407,3	534,0	77
Valor máximo	1.611,9	1.964,0	262
IC ↓	670,5	888,4	124
IC ↑	865,4	1.113,4	152
Teste de Wilcoxon	$p < 0,00001$		-

M: mãe; RN: recém-nascido; T: taxa de transferência; DP: Desvio padrão; IC ↓: Intervalo de confiança inferior; IC ↑: Intervalo de confiança superior; -: não se aplica.

Figura 1. Concentrações totais de IgG sérica (mg/dl) em amostras de soro materno e soro de seus respectivos recém-nascidos. RN: amostras de soro de cordão umbilical dos recém-nascidos. No gráfico estão representados os valores extremos, percentis 25% e 75%, mediana e média (+).

4.2 Concentrações de anticorpos IgA totais

As concentrações de anticorpos IgA totais presentes no colostro materno apresentaram grande amplitude de variação, com concentrações variando entre 0,000006 e 45,5 g/l, sendo a mediana de $7,3 \pm 9,5$ g/l.

TABELA 2. Análise estatística descritiva das concentrações de IgA secretória total (g/l) em 40 amostras de colostro materno

SIgA Total (g/l)	
Média	10,7
Mediana	7,3
DP	9,5
Valor mínimo	0,000006
Valor máximo	45,5
IC ↓	7,7
IC ↑	13,8

SIgA: IgA secretória; DP: Desvio padrão; IC ↓: Intervalo de confiança inferior; IC ↑: Intervalo de confiança superior.

Entre as amostras coletadas foi detectada uma parturiente com deficiência seletiva de IgA, cujas amostras de soro e colostro não apresentaram concentrações detectáveis de IgA (Tabela 2, Figura 2, Anexo 2).

Figura 2. Concentrações totais de IgA secretória nas amostras de colostro materno (g/l). A linha indica a mediana dos valores.

4.3 Títulos de anticorpos IgG séricos anti-*Bordetella pertussis*

A comparação dos níveis de anticorpos IgG anti-*B. pertussis* entre as amostras de soro materno e de seus RNs não revelou diferenças significativas ($1:225 \pm 1:370$ e $1:265 \pm 1:300$, respectivamente). Foi observada correlação entre as amostras de soro materno e seus RNs ($r = 0,74$, $p < 0,0001$), indicando uma boa taxa de passagem transplacentária de anticorpos anti-*B. pertussis*. Além disso, foi observada boa correlação inversa entre níveis de anticorpos IgG anti-*B. pertussis* maternos e taxa de transferência destes anticorpos ($r = -0,71$, $p < 0,0001$). A mediana da taxa de transferência de anticorpos IgG séricos anti-*B. pertussis* da mãe para seu recém-nascido foi de 118% (Tabela 3, Figura 3, Anexo 2).

TABELA 3: Análise estatística descritiva dos títulos de IgG anti-*B. pertussis* em 40 amostras pareadas de soro materno e de soro de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos e das taxas de transferência de IgG anti-*B. pertussis* (%)

IgG Sérica anti- <i>B. pertussis</i> (mg/dl)			
	M	RN	T (%)
Média	1:309	1:329	154
Mediana	1:225	1:265	118
DP	1:370	1:300	178
Valor mínimo	1:36	1:51	31
Valor máximo	1:1.898	1:1.639	1.215
IC ↓	1:191	1:233	97
IC ↑	1:428	1:424	211
Teste de Wilcoxon	$p > 0,05$		-

M: mãe; RN: recém-nascido; T: taxa de transferência; DP: Desvio padrão; IC ↓: Intervalo de confiança inferior; IC ↑: Intervalo de confiança superior; -: não se aplica.

Figura 3. Títulos de anticorpos IgG séricos anti-*B. pertussis* em amostras de soro materno e soro de seus respectivos recém-nascidos. RN: amostras de soro de cordão umbilical dos recém-nascidos. No gráfico estão mostrados os valores extremos, percentis 25% e 75%, mediana e média (+).

4.4 Títulos de anticorpos IgA séricos e secretores anti-*Bordetella pertussis*

A análise dos títulos de anticorpos SIgA anti-*B. pertussis* nas amostras de colostro materno mostrou grande amplitude de variação, com títulos variando entre 0 (parturiente deficiente de IgA) e 1:875 e mediana de 1:74 $\pm$ 1:146. Os títulos de anticorpos IgA nas amostras de soro materno variaram de 0 (parturiente deficiente de IgA) a 1:101, com mediana de 1:14 $\pm$ 1:17 (Tabela 4, Figura 4, Anexo 2).

TABELA 4. Análise estatística descritiva dos títulos de IgA anti-*Bordetella pertussis* nas amostras de colostro e soro materno

	SIgA anti-<i>B. pertussis</i> Colostro	IgA anti-<i>B. pertussis</i> Soro
Média	1:120	1:16
Mediana	1:74	1:14
DP	1:146	1:17
Valor mínimo	--	--
Valor máximo	1:875	1:101
IC ↓	1:73	1:11
IC ↑	1:167	1:22

SIgA: IgA secretória; DP: Desvio padrão; IC ↓: Intervalo de confiança inferior; IC ↑: Intervalo de confiança superior; -- : Título não detectável.

Títulos de anticorpos IgA anti-*B. pertussis* no soro materno foram significativamente mais baixos quando comparados aos títulos específicos de SIgA no colostro ($p < 0,0001$) e não foi detectada correlação entre eles.

No entanto, foi observada correlação significativa quando títulos de IgG e IgA específicos do soro materno foram comparados ($r = 0,45$, $p < 0,01$).

Figura 4. Títulos de anticorpos IgA anti-*B. pertussis* nas amostras de colostro e soro materno. A linha indica a mediana dos valores.

A análise estatística revelou títulos significativamente mais altos de IgG sérica anti-*B. pertussis* nas amostras de soro materno e de cordão umbilical quando comparados aos títulos de SIgA específicos nas amostras de colostro ($p < 0,0001$).

4.5 Títulos de anticorpos IgG e IgA específicos dos *Pools* Teste de Soro e Colostro

Os *pools* teste preparados com amostras de soro materno e soro de cordão umbilical com alto e baixo título de anticorpos anti-*B. pertussis* e os *pools* de colostro preparados com amostras com médio e baixo título de anticorpos anti-*B. pertussis* estão na Tabela 5. Para a análise do colostro

com alto título de anticorpos, foi utilizada apenas uma amostra que apresentou titulação alta de anticorpos específicos no colostro.

A dosagem de anticorpos IgG específicos realizada com a solução de imunoglobulina G humana (Octagam®) revelou um título de 1:2.560, enquanto que a dosagem de anticorpos IgM e IgA específicos resultou em títulos indetectáveis destes anticorpos.

TABELA 5. Títulos de anticorpos IgG séricos e IgA secretores anti-*B. pertussis* dos *pools* formados com amostras de soro materno, de soro de cordão umbilical (RN) e de colostro materno com alto, médio e baixo título de anticorpos específicos

	Alto	Médio	Baixo
<i>Pool</i> soro materno	1:732	--	1:39
<i>Pool</i> soro RN	1:666	--	1:48
<i>Pool</i> colostro	1:875*	1:203	1:27

-- : *Pool* não formado; *amostra individual de colostro.

4.6 Títulos de anticorpos IgG e IgA específicos dos *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle absorvidos com *B. pertussis*

A Tabela 6 mostra que após a absorção o título de anticorpos IgG anti-*B. pertussis* do *Pool* de Soro Humano Controle foi reduzido para 1,6% de seu título original e, o título de anticorpos IgA anti-*B. pertussis* do *Pool* de Colostro Humano Controle foi reduzido para 5,1% de seu título original.

TABELA 6. Título de anticorpos IgG e IgA específicos dos *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle antes e após a absorção com *B. pertussis*

	Antes	Após
<i>Pool</i> controle de soro	1:623	1:10
<i>Pool</i> controle de colostro	1:157	1:8

4.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Na Figura 5 podemos observar o perfil protéico do extrato bruto de proteínas de *B. pertussis* não reduzidas, em gel de SDS-PAGE com 12,5% de acrilamida, que apresenta bandas distribuídas entre 17 e 225 kDa.

Foi possível visualizar bandas que poderiam ser compatíveis com as principais proteínas da *B. pertussis*, aproximadamente com pesos de 220 kDa para expressão de FHA, 79 kDa para a subunidade B pentamérica da toxina pertussis e 68 kDa para pertactina.

Figura 5. SDS-PAGE em gel de acrilamida a 12,5% com extrato bruto da bactéria *Bordetella pertussis* com proteínas não reduzido (*B. p*). PM: Padrão de Peso Molecular. As setas indicam os pesos moleculares de 220, 79 e 68 kDa, possivelmente correspondendo às proteínas FHA, subunidade B da PT e pertactina.

4.8 Ensaio de Immunoblotting

A Figura 6 mostra o ensaio de Immunoblotting com extrato bruto de *B. pertussis* não reduzida e os *pools* de soro materno e de cordão umbilical com alto e baixo título de anticorpos IgG específicos, *pools* de colostro com médio e baixo título de anticorpos IgA específicos e as amostras de colostro com título alto de IgA anti-*B. pertussis* e da mãe com deficiência seletiva de IgA. A figura também mostra o conjunto de amostras pareadas de soro materno, soro de cordão e colostro da mãe número 13, escolhida aleatoriamente para a realização do teste.

O ensaio revelou um perfil de reconhecimento idêntico entre os *pools* de soro materno e dos respectivos RN com alto e baixo título de anticorpos específicos. No entanto, foi possível observar o reconhecimento de um maior número de bandas protéicas, algumas fortemente coradas, pelos *pools* com alta titulação de anticorpos específicos, demonstrando uma resposta mais intensa de anticorpos.

Os *pools* e amostras de colostro apresentaram diferentes intensidades em seu perfil de reconhecimento, que variaram de acordo com os títulos de anticorpos IgA específicos obtidos por ELISA, assim, notou-se a ausência de bandas na amostra da mãe com deficiência seletiva de IgA.

No conjunto de amostras pareadas (nº 13), foi possível observar que o soro do RN apresentou o mesmo perfil de reconhecimento que de sua mãe, porém com bandas mais fortemente coradas, mostrando correlação com o ensaio de ELISA, que apresentou titulação maior no soro do RN

(1:98) comparado ao de sua mãe (1:52), indicando uma eficiente passagem transplacentária (188%) de anticorpos anti-*B. pertussis*.

Figura 6. Immunoblotting em gel 12,5% com extrato bruto de bactérias não reduzido e: *pools* de soro materno (**M**) e *pools* de soro de cordão umbilical (**RN**) com alto e baixo título de anticorpos IgG específicos; *pools* de colostro com médio (**M**), baixo (**B**) e amostra de colostro com alto (**A**) título de anticorpos IgA específicos, e amostra de colostro de uma mãe com deficiência seletiva de IgA (**D**); e o conjunto de amostras de soro materno, de cordão umbilical e de colostro (**C**) da mãe número 13. Revelação com conjugado anti-IgG (soro) ou anti-IgA (colostro) humano, ambos diluídos 1:3.000. Padrões de PM à esquerda.

4.9 Capacidade neutralizante de anticorpos séricos e secretores

Uma vez que já está estabelecida a concentração de bactérias *B. pertussis* viáveis necessária para a obtenção de 100% de morte dos animais (2 a 3×10^4 bactérias diluídas em $30 \mu\text{l}$ de ácido casamínico), conforme descrito no teste para controle da potência da vacina DPT empregado pelo Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan, foram determinadas

as diluições dos *pools* controle necessárias para obter uma DE₅₀ (dose efetiva média) capaz de neutralizar o efeito das bactérias viáveis em 50% dos animais testados.

Em todos os testes de padronização realizados utilizou-se o controle positivo de bactéria, na ausência de soro ou colostro, para verificar capacidade letal da *B. pertussis*. Nestes testes de padronização foram testados 22 camundongos divididos em 3 ensaios, e todos morreram, representando 100% de morte. Já no controle negativo do teste, onde os *Pools* de Soro ou Colostro Humano controle foram inoculados nos camundongos na ausência de bactérias (n=12 para controle de soro e n=6 para controle de colostro), não houve mortes, indicando que essas amostras não tinham efeito letal quando inoculadas por via intracerebral nos camundongos.

O teste do Qui-Quadrado revelou diferenças significativas quando todos os *Pools* Teste de Soro e de Colostro foram comparados com o controle positivo, que apresentou 100% de morte dos animais testados ($p < 0,05$). Os ensaios realizados com os *Pools* Teste de soro materno e de soro de cordão umbilical revelaram que apenas os *pools* de soro com alto título de anticorpos IgG anti-*B. pertussis* foram capazes de neutralizar a bactéria e proteger mais de 50% dos animais testados. Os *pools* de soro materno e de cordão com baixo título de anticorpos específicos não foram capazes de proteger 50% dos animais testados (Tabela 7, Figura 7).

TABELA 7. Teste de neutralização de *B. pertussis* em camundongos *Swiss* com os *pools* de soro e colostro teste com alto, médio e baixo título de anticorpos, com a amostra de colostro com alto título de anticorpos e com a amostra de colostro da parturiente deficiente de IgA, testados na diluição de 1:50.

GRUPOS	Nº de Animais Testados / Sobreviventes (%)
<i>Pool</i> soro materno alto	20 / 14 (70%)
<i>Pool</i> soro materno baixo	20 / 6 (30%)
<i>Pool</i> soro RN alto	20 / 13 (65%)
<i>Pool</i> soro RN baixo	20 / 7 (35%)
Amostra colostro alto	20 / 14 (70%)
<i>Pool</i> colostro médio	30 / 16 (53,3%)
<i>Pool</i> colostro baixo	20 / 9 (45%)
Amostra colostro IgAD*	20 / 9 (45%)
Controle positivo	30 / 0 (0%)

*IgAD: parturiente com deficiência seletiva de IgA.

Com relação às amostras de colostro, apenas a amostra com alto título e o *pool* com título médio de anticorpos IgA específicos foram capazes de neutralizar a bactéria e proteger mais de 50% dos animais testados (70 e 53,3%, respectivamente). Tanto o *pool* de colostro com baixo título de anticorpos IgA específicos, como a amostra de colostro da parturiente com deficiência seletiva de IgA foram capazes de proteger 45% dos animais testados (Tabela 7, Figura 7).

Figura 7. Estabelecimento de um modelo experimental de neutralização de *Bordetella pertussis* em camundongos Swiss, utilizando *Pools* Teste de Soro e Colostro Humano diluídos 1:50, inoculados por via intracerebral juntamente com 2 a 3×10^4 bactérias em $30 \mu\text{l}$. Os resultados foram expressos pela porcentagem de animais sobreviventes dentro de um período de observação de 14 dias. **Mãe Alto:** *pool* de soro materno com alto título de anticorpos IgG específicos; **Mãe Baixo:** *pool* de soro materno com baixo título de anticorpos IgG específicos; **RN Alto:** *pool* de soro de cordão umbilical com alto título de anticorpos IgG específicos; **RN Baixo:** *pool* de soro de cordão umbilical com baixo título de anticorpos IgG específicos; **Col Alto:** amostra de colostro com alto título de anticorpos IgA específicos; **Col Médio:** *pool* de colostro com título médio de anticorpos IgA específicos; **Col Baixo:** *pool* de colostro com baixo título de anticorpos IgA específicos; **Col IgAD:** amostra de colostro da mãe com deficiência seletiva de IgA; **Controle Pos:** Controle positivo do teste contendo 2 a 3×10^4 bactérias em $30 \mu\text{l}$ na ausência dos *pools*. *: diferença significativa.

O *Pool* de Soro Humano Controle, assim como o *Pool* de Colostro Humano Controle, antes de serem absorvidos com *B. pertussis* foram capazes de proteger 80% e 92,6% dos animais, respectivamente, neutralizando o efeito patogênico das bactérias viáveis. Estes mesmos *pools* de soro e colostro, após a absorção, sofreram grande redução na sua

capacidade de neutralizar a bactéria e proteger os camundongos no desafio intracerebral, revelando apenas 30% de proteção em ambos os casos (Tabela 8, Figura 8).

A solução de Imunoglobulina G Humana (Octagam) foi capaz de proteger 65% dos animais testados (Tabela 8, Figura 8).

TABELA 8. Teste de especificidade da neutralização de *B. pertussis* em camundongos *Swiss* com os *pools* controle de soro e colostro, testados antes e após a absorção com *B. pertussis* e com a solução de Imunoglobulina G Humana (Octagam)

GRUPOS	Nº de Animais Testados / Sobreviventes (%)
<i>Pool</i> soro controle	30 / 24 (80%)
<i>Pool</i> soro controle absorvido	10 / 3 (30%)
<i>Pool</i> colostro controle	27 / 25 (92,6%)
<i>Pool</i> colostro controle absorvido	10 / 3 (30%)
Imunoglobulina G Humana (Octagam)	20 / 13 (65%)
Controle Positivo	30 / 0 (0%)

Nº: número.

Figura 8. Modelo experimental de neutralização de *Bordetella pertussis* em camundongos Swiss, utilizando *Pools* Controle de Soro e Colostro Humanos, absorvidos ou não com *B. pertussis*, e a solução de Imunoglobulina G Humana (Octagam), todos diluídos 1:50 e inoculados por via intracerebral juntamente com 2 a 3×10^4 bactérias em $30 \mu\text{l}$. **Soro Contr:** *Pool* de Soro Humano Controle; **Soro Contr Abs:** *Pool* de Soro Humano Controle absorvido; **Col Contr:** *Pool* de Colostro Humano Controle; **Col Contr Abs:** *Pool* de Colostro Humano Controle absorvido; **Controle Pos:** controle positivo do teste contendo 2 a 3×10^4 bactérias em $30 \mu\text{l}$ na ausência dos *pools*.

A análise estatística revelou que as capacidades protetoras dos *pools* de soro e colostro estão correlacionadas com os títulos de anticorpos anti-*B. pertussis* ($r = 0,70$, $p < 0,01$).

5. DISCUSSÃO

Há um grande conjunto de evidências, baseadas principalmente em experimentos de imunização passiva, que anticorpos desempenham um papel na proteção contra a *B. pertussis* (Bruss e Siber, 1999; Granstrom et al., 1991; Redhead, 1995). Os anticorpos podem atuar na neutralização das toxinas bacterianas, na inibição da adesão bacteriana à superfície mucosa, ou promover a captação e destruição bacteriana por macrófagos e neutrófilos.

Demonstramos neste trabalho, através da análise imunoquímica, a presença de anticorpos IgG em amostras de soro materno e de cordão umbilical de recém-nascidos a termo, bem como de anticorpos IgA secretórios (SIgA) em amostras de colostro humano dirigidos a *Bordetella pertussis*. Foi observada uma eficiente transmissão de anticorpos IgG específicos pela placenta, revelada pela mediana da taxa de transferência de anticorpos IgG acima de 100% e níveis variáveis de anticorpos IgA específicos presentes no colostro materno.

Foram estabelecidas correlações entre os níveis de anticorpos IgG totais e específicos detectados nos neonatos quando comparados às suas respectivas mães, o que só vem a confirmar a relação estreita entre os níveis de anticorpos maternos e níveis neonatais. Correlações inversas foram estabelecidas comparando-se os níveis de IgG totais e específicos maternos com as taxas de transferência destes anticorpos. Estes resultados demonstram que quanto menores os níveis de IgG maternos, maiores são

as taxas de transferência destes anticorpos, sugerindo uma potencialização da passagem transplacentária.

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

Vários estudos na literatura mostram uma eficiente passagem transplacentária de anticorpos específicos a antígenos protéicos, lipopolissacarídicos e polissacarídicos para recém-nascidos a termo (Samsami Dehaghani et al., 2003; Nagao et al. 1998; Palmeira et al., 2007; Carvalho et al., 1999). Alguns estudos determinaram a passagem transplacentária de anticorpos específicos para *B. pertussis* (de Voer et al., 2009; Van Savage et al., 1990). Healy et al. (2004) ao avaliar amostras pareadas de soro materno e de cordão umbilical observaram uma eficiente passagem transplacentária de anticorpos específicos anti-PT, anti-FHA e anti-FIM ao neonato, com taxa de transferência acima de 150% para todos os anticorpos específicos e a cinética do declínio da concentração destes anticorpos passivamente adquiridos aos dois meses de idade. O mesmo foi visto por Gonik et al. (2005), que observaram uma eficiente passagem transplacentária de anticorpos anti-PT, anti-FHA e anti-PRN analisando amostras pareadas de soro materno e de cordão umbilical de recém-nascidos a termo.

Embora tenha sido relatado que crianças expostas a *Bordetella pertussis* são menos propensas a adquirir a doença na sua forma grave se apresentarem altos níveis de anticorpos contra certos antígenos após a imunização, ainda não foi possível definir o nível de anticorpos contra um único antígeno ou uma combinação de antígenos que prevê proteção (Storsaeter et al., 1998; Cherry et al., 1998; Taranger et al., 2000).

Em nosso trabalho, o teste de Immunoblotting confirmou claramente os resultados obtidos no ELISA, ou seja, uma eficiente passagem transplacentária de anticorpos anti-*B. pertussis* para o recém-nascido, evidenciada por perfis de reconhecimento idênticos entre os *pools* de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos. Além disso, o reconhecimento mais intenso dos antígenos pelos soros de recém-nascidos quando comparados aos de suas mães, enfatiza a eficiente transmissão de anticorpos ao neonato. Os estudos realizados por Nagao et al. (1998) e Palmeira et al. (2007) também revelaram, através de ensaio de Immunoblotting, padrões de reconhecimento idênticos dos antígenos de *Escherichia coli* entre as amostras pareadas de soro materno e de cordão umbilical.

Em contrapartida, através da análise dos *pools* de colostro foi possível observar perfeitamente que a intensidade de reconhecimento dos antígenos bacterianos varia de acordo com a titulação de anticorpos IgA específicos.

Interessantemente, confirmando os resultados observados no ensaio imunoenzimático, o Immunoblotting também revelou que os *pools* de colostro apresentam reconhecimento menos intenso de *B. pertussis* quando

comparados aos *pools* de soro materno e de cordão umbilical, confirmando níveis de anticorpos IgA secretores específicos mais baixos do que os níveis séricos de IgG anti-*B. pertussis*.

Diversos trabalhos na literatura, utilizando modelos experimentais de adesão bacteriana *in vitro* com diferentes linhagens de *Escherichia coli*, demonstraram a presença de SIgA no colostro e leite humano e sua capacidade de inibir a aderência bacteriana em células em cultura (Delneri et al., 1997; Carbonare et al., 1997; Palmeira et al., 2005; Correa et al., 2006). Uma vez que o *homing* de linfócitos para a glândula mamária é induzido no tecido linfóide associado à mucosa (MALT), numa população heterogênea, diferentes títulos e especificidades de anticorpos podem ser encontrados em amostras de colostro de acordo com a variabilidade de exposição aos diversos antígenos. Essa mesma variação foi observada em nosso estudo, no entanto foram encontrados títulos mais baixos de anticorpos IgA específicos para *B. pertussis* quando comparados aos níveis de IgA específicos para bactérias entéricas encontrados na literatura (Palmeira et al., 2005), o que demonstra, neste estudo, que os níveis desses anticorpos presentes nas amostras de colostro materno refletem um menor grau de exposição, de um modo geral, a *Bordetella pertussis*.

Em outro trabalho, foi demonstrado que o colostro e leite de mães de bebês pré-termo e bebês a termo pequenos para a idade gestacional (PIG) foram capazes de inibir fortemente a adesão de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) em células epiteliais em cultura, em níveis equivalentes ao colostro e leite de mães de bebês nascidos a termo com peso adequado para a idade

gestacional (AIG). E, além disso, embora os níveis de IgA total e anti-EPEC fossem mais baixos em amostras de leite quando comparadas as de colostro, os níveis de inibição da adesão de EPEC foram equivalentes, sugerindo que os níveis de IgA encontrados no leite maduro são suficientes para promover altos níveis de inibição de adesão (Delneri et al., 1997).

Em nosso estudo, foi observado que apenas uma amostra de colostro apresentou níveis de anticorpos SIgA específicos mais elevados quando comparada às outras 39 amostras. Neste caso, que coincidentemente se tratou de um neonato a termo PIG, a taxa de transferência de anticorpos IgG específicos para o recém-nascido foi a menor do grupo amostral (31%), mas o alto título de anticorpos SIgA específicos no colostro materno sugere um mecanismo de compensação na ausência de uma eficiente passagem transplacentária de anticorpos IgG específicos.

Uma vez que vários fatores de virulência, incluindo FHA, PRN, FIM e PT estão envolvidos na adesão de *B. pertussis* em células do epitélio respiratório (van't Wout et al., 1992; Loch et al., 1993; Funnell e Robinson, 1993), a capacidade dos anticorpos inibirem a aderência em células em cultura deve-se, em teoria, fornecer um ensaio funcional útil para quantificar anticorpos que previnem a infecção no trato respiratório. De fato, foi demonstrado que anti-soro de criança imunizada com DTPw inibe a aderência bacteriana *in vitro* em células do epitélio respiratório humano (Tuomanen et al., 1984). Anticorpos reativos com FIM bloquearam a aderência de *B. pertussis* em células Vero (linhagem celular derivada do rim do macaco verde Africano), (Gorringe et al., 1985) e células HeLa (linhagem

celular humana maligna derivada de carcinoma cervical) (Redhead, 1985), e anticorpos contra os FHA, PT, PRN, LPS e uma proteína de 40-kDa da membrana externa, também inibem a aderência bacteriana em células epiteliais brônquicas humanas (Tuomanen et al., 1984; van den Berg et al., 1999).

Todos os estudos de avaliação de anticorpos específicos para *B. pertussis* relatam o aumento dos níveis desses anticorpos após a imunização com DTPw e DTPa, porém não comprovam sua participação na proteção (Simondon et al., 1997; Olin et al., 1997; Greco et al., 1996; Gustafsson et al., 1996; Trollfors et al., 1995). Mas estudos sorológicos com amostras pós-vacinais de crianças imunizadas somente com a PT relatam que as crianças que mostram níveis aumentados de anticorpos IgG anti-PT são improváveis de desenvolver infecção grave por *B. pertussis* (Taranger et al., 2000).

Trabalhos evidenciam que a avaliação dos níveis de anticorpos IgG por ELISA não é capaz de discriminar anticorpos que se ligam aos determinantes conformacionais em estruturas nativas ou determinantes lineares em proteínas desnaturadas, e pode não prever se esses anticorpos terão a capacidade de limitar a infecção natural (Mills, 2001). Deste modo, modelos experimentais *in vivo* podem demonstrar a atividade funcional dos anticorpos na neutralização da patogenia bacteriana.

Estudos de imunização passiva em camundongos demonstraram que anticorpos contra PT, FIM e LPS podem conferir proteção contra *B. pertussis* (Bruss e Siber, 1999; Redhead, 1995). Interessantemente, anticorpos anti-

FHA falharam na proteção em desafio intracerebral (Munoz et al., 1981; Oda et al., 1984) e foram menos protetores em desafio respiratório (Mills et al., 1998a) e, em dados recentes de estudos de contato doméstico foi observado que o FHA é o antígeno menos importante na indução da proteção (Storsaeter et al., 1998; Cherry et al., 1998). Além disso, experimentos de imunização passiva e ativa em camundongos demonstraram que anticorpos anti-PT e anti-PRN sozinhos promovem maior proteção (Mills et al., 1998b). Portanto, é de se entender que quanto maior a quantidade de antígenos, melhor é a eficácia em promover a proteção contra *B. pertussis*.

Diante disso, decidimos estudar a capacidade neutralizante dos anticorpos anti-*B. pertussis* séricos e secretores em testes *in vivo*. Em nosso trabalho, no desafio intracerebral em camundongos foi demonstrada a capacidade dos *pools* de soro e de colostro humano de neutralizar a patogenia da *Bordetella pertussis* quando comparados ao controle positivo de bactérias. Essa neutralização ocorreu, até certo ponto, de modo dose-dependente do título de anticorpos específicos, indicando que a mãe tem a capacidade de prover uma proteção completa, tanto sérica, como secretória ao seu filho, embora tenham sido detectados títulos mais baixos de anticorpos IgA anti-*B. pertussis* nas amostras de colostro quando comparados aos títulos séricos de anticorpos IgG específicos.

Analisando-se o *pool* de soro materno com titulação alta de anticorpos IgG anti-*B. pertussis*, observou-se que este tem capacidade protetora significativamente maior comparado ao *pool* de soro materno com baixa

titulação, sendo o mesmo observado com os *pools* de soro de recém-nascidos com alta e baixa titulação.

A observação de que a amostra de colostro da parturiente com deficiência seletiva de IgA protegeu 45% dos animais sugere que a neutralização da patogenia bacteriana não é somente decorrente da atividade funcional de anticorpos séricos e secretores específicos e, podemos sugerir que fatores anti-infecciosos presentes no soro e colostro humanos podem contribuir de modo inespecífico para a neutralização bacteriana.

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, analisando amostras de colostro, foi encontrada uma parturiente com deficiência seletiva de IgA e, surpreendentemente, essa amostra foi capaz de inibir tanto a aderência de EPEC, como a invasão por *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) em células epiteliais em cultura em níveis equivalentes às amostras de colostro de mães saudáveis (dados não publicados). O estudo de amostras de colostro de duas lactantes com Imunodeficiência Comum Variável revelou alta capacidade inibitória da adesão de EPEC em células epiteliais em cultura e, no entanto, ambas não apresentavam anticorpos IgA no colostro e sim, anticorpos IgM e IgG, estes últimos adquiridos por terapia com gamaglobulina intravenosa, os quais foram capazes de neutralizar a adesão bacteriana (Palmeira et al., 2009).

Não podemos deixar de citar o importante mecanismo de compensação observado em pacientes com deficiência seletiva de IgA, onde são observados níveis elevados de IgM secretória nas mucosas

(Macpherson et al., 2008). No entanto, este fenômeno não foi observado em nosso trabalho, pois os títulos de anticorpos IgM e IgG totais e específicos para *B. pertussis* na amostra de colostro da parturiente em questão se apresentaram dentro dos valores de normalidade.

Contudo, esses dados reforçam a importância do aleitamento materno como forma de melhorar as condições de saúde das crianças nos países em desenvolvimento, como o nosso.

No leite humano, além de fatores específicos, como a SIgA, que está presente em maior abundância no colostro humano e apresenta reatividade aos diversos antígenos com o qual a mãe entrou em contato durante toda sua vida, estão presentes diversos componentes anti-infecciosos inespecíficos que são capazes de inibir a patogenia bacteriana (Hamosh, 2001).

Além de sua função básica de neutralização antigênica, a SIgA age também como opsonina, como foi visto para EPEC, promovendo sua morte por fagócitos mononucleares presentes no colostro humano (Honório-França et al., 1997).

Wolfe et al. (2007) relataram que anticorpos IgA séricos são requeridos para promover a redução do número de *B. bronchiseptica* do trato respiratório superior em modelo experimental murino, mas não são necessários para a proteção contra *B. pertussis*. No entanto, cuidados devem ser tomados ao extrapolar estudos em modelos animais para humanos, pois estes autores discutem que embora anticorpos IgA não

tenham sido importantes na proteção contra a infecção por *B. pertussis* em camundongos, eles podem ter participação na proteção em humanos.

Em contrapartida, Hellwig et al. (2001a) mostraram que o receptor Fc α humano para IgA expresso em fagócitos polimorfonucleares de camundongos transgênicos é capaz de induzir a atividade bactericida sobre *B. pertussis* opsonizada com anticorpos IgA séricos, controlando a infecção, o que não é observado em camundongos não transgênicos. Isto é, uma vez que humanos expressam este tipo de receptor, a IgA sérica pode agir se ligando ao receptor, induzindo assim, opsonização bacteriana para células polimorfonucleares e consequente morte bacteriana.

Existem diferenças substanciais na imunidade mediada por IgA entre camundongos e humanos em relação aos receptores para IgA que eles expressam (Decot et al., 2005). Enquanto a maioria dos estudos em modelo murino mostra a forte indução de anticorpos protetores, alguns deles demonstraram proteção com mínimas ou indetectáveis respostas de anticorpos (Shahin et al., 1990; Mills et al., 1993), ou não conseguiram mostrar uma correlação entre títulos de anticorpos séricos e proteção contra o desafio respiratório em camundongos (Mills et al., 1998a; Ashworth et al., 1982).

Ao dosarmos anticorpos IgA anti-*B. pertussis* nas amostras de soro materno observamos baixos níveis desses anticorpos, o que está dentro da normalidade quando se trata de anticorpos séricos de classe IgA. Foram reveladas, através da análise estatística, correlações entre anticorpos IgG e

IgA séricos específicos para *B. pertussis* e, por outro lado, uma falta de correlação entre anticorpos IgA séricos e secretores.

Um fato interessante é que vários estudos foram realizados mostrando que anticorpos IgA secretórios não são produzidos após imunização com as vacinas DTPw ou DTPa, e que somente a infecção natural é que induz produção de SIgA no trato respiratório (Redhead et al., 1993; Tuomanen et al., 1984). Então, é possível sugerir que aquelas mães que apresentaram uma titulação mais elevada de anticorpos SIgA específicos no colostro podem ter tido um contato com a bactéria, mas não necessariamente tenham evoluído para a doença.

Deste modo, no intuito de tentar esclarecer se anticorpos específicos, IgG ou IgA, promovem a proteção contra *B. pertussis* resolvemos realizar a absorção dos *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle utilizados nos testes *in vitro* com a *B. pertussis*, o que resultou em uma redução substancial nos títulos de anticorpos específicos. Embora tenha sido observada uma maior porcentagem de morte dos camundongos testados com os pools absorvidos, ainda foram encontradas capacidades neutralizantes significativas, com proteção de 30% dos animais testados, o que indica que outros fatores presentes no soro e colostro são capazes de neutralizar a patogenia bacteriana e promover proteção dos camundongos desafiados.

Além disso, decidimos avaliar o título de anticorpos IgG anti-*B. pertussis* em uma solução de imunoglobulina intravenosa composta por 95% de anticorpos de classe IgG e traços de anticorpos IgM ou IgA (Octagam®

Octapharma, Áustria). A análise revelou uma alta concentração de anticorpos específicos para *B. pertussis* e esta solução com IgG purificada revelou capacidade neutralizante com proteção de 65% dos animais desafiados no ensaio intracerebral.

Os resultados obtidos com estes testes confirmam a participação de anticorpos específicos e fatores anti-infecciosos inespecíficos presentes no soro e colostro na proteção contra *B. pertussis*, já que os *pools* sem anticorpos específicos ainda protegeram os animais e a IgG purificada, contendo alta titulação de anticorpos específicos não foi capaz de proteger 100% dos animais testados.

A resposta imune para *B. pertussis* é mais complexa do que para o tétano e a difteria, pois estão presentes vários antígenos implicados na patogenia bacteriana. Além de se aderir à mucosa e multiplicar-se extracelularmente, ela também invade as células e, após ser fagocitada por macrófagos, tem a capacidade de sobreviver em seu interior, o que evidencia a importância da imunidade celular na proteção contra este patógeno (Mills, 2001).

Foi relatado que a infecção natural ou imunização com vacinas pode induzir resposta imune específica composta por linfócitos T e anticorpos contra PT, FHA, PRN, FIM, CyaA, LPS, além de outros antígenos ainda não identificados (Leef et al., 2000; Mills et al., 1998b). Experiências em modelos animais forneceram evidências convincentes de que ambas as respostas imunológicas, humoral e celular, são necessárias para uma imunidade efetiva (Mills, 2001).

Anticorpos opsonizantes que promovem a ligação de *B. pertussis* em macrófagos ou fagócitos polimorfonucleares tem sido detectados em amostras de soro de pacientes com coqueluche, em indivíduos imunizados com DTPw (Steed et al., 1992; Cheers e Gray, 1969; Steed et al., 1991) e no fluido de lavado broncoalveolar de camundongos infectados (Hellwig et al., 1999). Foi sugerido que a captação de *B. pertussis* por polimorfonucleares humanos é estritamente dependente da opsonização por anticorpos, enquanto que a entrada da bactéria em macrófagos pode ocorrer sem opsonização (Steed et al., 1992; Steed et al., 1991).

Sabe-se que o padrão de resposta imune se diferencia de acordo com a vacina ou infecção natural, sendo que, a DTPw ou infecção natural promove um padrão de resposta imune Th1, a qual é ativada principalmente pelo LPS, induzindo a produção de IFN- γ , ativando células B a produzirem anticorpos opsonizantes, além de ativar macrófagos a induzir morte intracelular bacteriana e recrutar e ativar neutrófilos através de citocinas inflamatórias. Já a DTPa, promove um padrão de resposta imune Th2, com produção de várias interleucinas, principalmente IL-4 e IL-5 que ativam células B a produzirem anticorpos neutralizantes e com capacidade inibitória sobre a aderência bacteriana (Ausiello et al., 1997).

O papel do IFN- γ é também de grande importância e vários estudos foram realizados mostrando a resposta imune em camundongos *knockouts*. Um desses estudos mostrou que os animais transgênicos produtores de baixos níveis de IFN- γ tem menor sobrevida (Barnard et al., 1996),

ênfatizando a importância desse fator na proteção contra bactérias patogênicas.

Respostas imunes celulares, em particular, os mecanismos efetores mediados por IFN- γ são necessários para prevenir a disseminação de *B. pertussis* no trato respiratório durante a infecção primária, como foi observado em modelo murino. O IFN- γ secretado precocemente por células da imunidade inata suprime a infecção antes do desenvolvimento da resposta Th1. Contudo, células Th1 são eventualmente geradas e iniciam um papel essencial na eliminação bacteriana. Após uma infecção primária, a resposta imune adquirida é muito eficaz em lidar com uma exposição subsequente. Em síntese, a imunidade celular, juntamente com anticorpos opsonizantes, estimulados por células Th1, são os mecanismos efetores que eliminam uma infecção primária e conferem proteção contra a exposição secundária a *B. pertussis* (Mills, 2001).

Recentes estudos mostraram que IgG e IgA anti-*B. pertussis* são capazes de induzir a fagocitose, *burst* respiratório e morte bacteriana (Hellwig et al., 2001a; Rodriguez et al., 2001). Além disso, demonstraram que esta bactéria é menos eficientemente eliminada de camundongos deficientes de receptores para IgG (Fc γ R) (Hellwig et al., 2001b), e sugerem que IgG também é essencial para a ativação de leucócitos efetores *in vivo*.

Embora a presença de anticorpos IgG reativos com *B. pertussis* adquiridos por transferência placentária já tenha sido demonstrada, entre os 2 e 6 meses de vida, a maioria dos lactentes não apresenta anticorpos específicos detectáveis, o que enfatiza a possível ausência de proteção

imediatamente após o nascimento (Healy et al., 2004; Belloni et al., 2003). Estes dados reforçam ainda mais a idéia de que o aleitamento materno pode prover uma proteção eficiente durante este período.

A vacinação materna oferece uma maior possibilidade de proteger os bebês desde o nascimento até que a imunidade ativa seja induzida pela vacinação, e tem se mostrado eficaz e segura para o tétano desde 1970, não apresentando nenhuma evidência de efeitos deletérios para a gestante ou para o recém-nascido. O mesmo foi observado para o pneumococo, vírus influenza e poliovírus (Shahid et al., 1995; Harper et al., 2005; Wassilak et al., 2004).

A proteção direta do recém-nascido pode ser conferida pela vacinação materna ou neonatal (Lichty et al., 1938; Mishulow et al., 1942; Cohen e Scadron 1943; Kendrick et al., 1945; Cohen e Scadron 1946; Adams et al., 1947; Belloni et al., 2003; Knuf et al., 2008). Comparada com a vacinação neonatal, a vacinação materna tem várias vantagens, primeiro porque ela oferece proteção ao nascimento até que a imunidade neonatal seja alcançada pela vacinação ativa, em contraste, a vacinação neonatal deixaria o bebê suscetível à doença por um período de semanas a meses dependendo da velocidade com que a imunidade é induzida. Além disso, em todos os estudos de imunização materna envolvendo humanos, os níveis de anticorpos específicos para *B. pertussis* aumentaram nos recém-nascidos de mães vacinadas quando comparados aos que não tiveram suas mães vacinadas e, de acordo com os autores, as reações sistêmicas observadas nas mães foram poucas e sem gravidade. O mais importante foi a ausência

de efeitos adversos durante a gestação, no parto e no recém-nascido. Além disso, não foi mencionado aborto como resultado da vacinação materna (Mooi e Greeff, 2007).

Atualmente, não existem estudos disponíveis na literatura que avaliem a resposta de anticorpos ou sua proteção após a imunização materna com vacinas acelulares (Wood e McIntyre, 2008). O desenvolvimento de vacinas acelulares com diferentes tipos de antígenos também poderia oferecer novas possibilidades neste campo, uma vez que os resultados de ensaios clínicos demonstram claramente uma reatogenicidade significativamente reduzida após imunização com DTPa, quando comparada a DTPw (Olin et al., 1997; Greco et al., 1996; Gustafsson et al., 1996; Trollfors et al., 1995; Edwards et al., 1999).

Embora a DTPw seja reatogênica, hoje é considerada segura e eficaz. Muitos eventos adversos graves antes atribuídos a essa vacina não mostraram relação entre causa e efeito após a aplicação de métodos epidemiológicos modernos na investigação desses episódios. A vacina não é responsável por morte súbita em crianças ou encefalopatias com lesões permanentes. Entretanto, ainda hoje, quando há associação entre a vacinação e evento adverso grave ou óbito, frequentemente atribui-se à DTPw esta responsabilidade.

Um estudo brasileiro, com cerca de 21.000 mães ou responsáveis, entrevistados antes e após a vacinação com a vacina tetravalente (DTPw+Hib), mostrou que a vacina brasileira não é mais reatogênica que as internacionais, com taxas de convulsão de 1 para 5.266 vacinados e de

síndrome hipotônico-hiporresponsiva de 1 para 1.505 vacinados (Brasil, Ministério da Saúde, 2006).

Existem outras maneiras de se obter uma considerável redução do número de casos de coqueluche, particularmente entre crianças menores de um ano de idade, como por exemplo, as estratégias citadas por Forsyth et al. (2005), onde uma equipe multidisciplinar de especialistas chamada *The Global Pertussis Initiative* (GPI), criada em 2001, avaliou 7 estratégias potenciais de imunização contra coqueluche. Essas estratégias incluem: vacinação universal em adulto e/ou adolescente, proteção indireta do neonato por imunização dos familiares e outros contatos possíveis, como avós e trabalhadores da área de saúde, além de imunização neonatal e imunização materna.

Em países como Austrália, França, Alemanha, Estados Unidos e Áustria, é recomendado que todos os familiares dos recém-nascidos recebam uma dose de reforço da DTPa logo após seu nascimento. Foi demonstrado que a combinação de uma rotina de vacinação no adulto, a cada 10 anos, a partir dos 20 anos de idade e vacinação seletiva de contatos familiares dos recém-nascidos resultou numa ótima redução na incidência da coqueluche na criança (Van Rie e Hethcote, 2004).

Austrália, Bélgica, França, Alemanha, Israel, Itália, Japão, Suíça, Canadá e Estados Unidos aboliram a utilização da DTPw. Entre os países com representantes no grupo de especialistas internacionais que trabalham nas estratégias para o controle da coqueluche (GPI), somente o Brasil e a Argentina ainda utilizam a vacina DTPw (Tan et al., 2005).

O Canadá, a França, Alemanha e Austrália modificaram o calendário de imunização contra coqueluche devido ao aumento da incidência de casos da enfermidade em adolescentes e adultos, que agora, recebem a vacina acelular como dose reforço.

No Brasil, até o momento somente a Refortrix[®], nome comercial da vacina DTPa da GlaxoSmithKline, que contém filamentos de hemaglutinina, toxóide pertussis e pertactina, além dos toxóides tetânico e diftérico, está licenciada para ser comercializada, sendo indicada para vacinação de reforço para adolescentes e adultos a partir de 10 anos de idade (de Carvalho e Pereira, 2006).

Esses dados de imunização na adolescência mostram que esse caminho seria certamente uma forma de se obter a redução da incidência de casos da coqueluche e transmissão para crianças menores de um ano em nosso país, uma vez que adolescentes e adultos representam fonte de infecção para crianças que, por sua vez, apresentam maior suscetibilidade à doença. Além disso, a imunização de jovens e adultos que entram em idade fértil é de grande importância e tem como objetivo promover o aumento dos níveis de anticorpos anti-*B pertussis* neste período.

Mas o maior obstáculo é a distribuição da vacina acelular em postos da rede pública de atenção à saúde. O Programa Nacional de Imunizações ainda não incluiu a vacina tríplice bacteriana acelular no calendário de rotina devido a vários fatores: a uma menor eficácia quando comparada às vacinas celulares na prevenção da coqueluche em todas as suas formas clínicas; em geral, as vacinas acelulares, quando combinadas com a vacina Hib, são

menos imunogênicas contra este último antígeno do que as vacinas celulares; a tríplice bacteriana celular é produzida no Brasil; e o custo das vacinas acelulares é muito maior. Diante dessas circunstâncias, a vacina acelular está disponível somente nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIE), para casos específicos.

Em síntese, existem várias maneiras de imunização que podem ser eficientes na tentativa de reduzir a incidência de coqueluche e aumentar a concentração de anticorpos específicos a serem transmitidos ao recém-nascido. Por isso, se torna difícil sugerir qual a melhor maneira de se obter melhores resultados. Talvez a união de dados presentes na literatura e a realização de outros estudos de eficácia vacinal possam esclarecer essas dúvidas.

Uma vez que foi demonstrada, em nosso estudo, a eficácia dos anticorpos anti-*Bordetella pertussis* em neutralizar a patogenia bacteriana através do teste de neutralização das bactérias viáveis em camundongos e, embora tenham sido detectados títulos mais baixos de anticorpos IgA específicos nas amostras de colostro quando comparados aos títulos séricos de anticorpos IgG específicos, ambos foram capazes de neutralizar a capacidade letal de *B. pertussis* nos animais de modo dose-dependente, indicando que a mãe tem a capacidade de prover uma proteção completa, tanto sérica, como secretória ao seu filho. Estes dados enfatizam a importância destes anticorpos na proteção de recém-nascidos contra infecções respiratórias causadas por *Bordetella pertussis*.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1 Foi observada uma eficiente transmissão passiva para o recém-nascido de anticorpos IgG e de anticorpos IgA reativos com *Bordetella pertussis* através da passagem transplacentária e colostro materno.

6.2 Foi demonstrada neutralização eficaz da patogenia bacteriana por anticorpos anti-*B. pertussis* e, embora títulos mais baixos de IgA específica tenham sido encontrados nas amostras de colostro quando comparados aos títulos de IgG específica das amostras de soro, ambos foram capazes de neutralizar a patogenia de *B. pertussis in vivo*.

Os resultados demonstraram que a atividade protetora *in vivo* está relacionada com níveis de anticorpos específicos, visto que, amostras com títulos de anticorpos anti-*B. pertussis* mais altos apresentaram maior capacidade neutralizante, dando indícios que a vacinação materna pode, de fato, prover melhor proteção para o recém-nascido. O presente trabalho enfatiza a importância da passagem transplacentária e do aleitamento materno na proteção contra infecções respiratórias causadas por *Bordetella pertussis*.

7. ANEXOS

Anexo A. Idade das parturientes, tipo de parto, idade gestacional, peso, classificação e sexo de seus respectivos recém-nascidos.

Parturientes	Idade M (anos)	Parto	Id gest (semanas)	Peso RN (gramas)	Classificação	Sexo RN
1. PV	27	vaginal	39	3.326	AIG	F
2. RMS	27	cesárea	39	3.326	AIG	M
3. MNPO	27	vaginal	39	3.326	AIG	F
4. JS	30	cesárea	39	3.775	AIG	M
5. SFM	27	vaginal	39	3.326	AIG	M
6. ED	27	cesárea	39	3.326	AIG	F
7. EAGP	38	cesárea	39 2/7	3.295	AIG	M
8. EBC	25	cesárea	40	3.810	GIG	M
9. DSS	22	cesárea	40	3.405	AIG	F
10. CSC	32	vaginal	38 3/5	3.130	PIG	F
11. RMDC	29	cesárea	39 4/7	3.435	AIG	M
12. LES	34	cesárea	38 4/7	3.290	AIG	M
13. RMSA	22	cesárea	39 6/7	4.185	AIG	M
14. CACS	22	cesárea	38 1/7	3.425	GIG	F
15. LVS	25	cesárea	39	3.350	AIG	F
16. SAG	22	vaginal	39	3.205	AIG	M
17. SRCS	26	vaginal	39 4/7	3.490	AIG	F
18. VRV	23	vaginal	39	3.215	AIG	F
19. ELC	33	vaginal	39	3.540	AIG	M
20. FB	23	vaginal	40	3.160	AIG	M
21. CAK	41	vaginal	39	3.510	AIG	M
22. PAMC	30	vaginal	39	2.960	AIG	M
23. AMC	37	cesárea	39	2.795	AIG	F
24. FOB	18	vaginal	37 3/7	3.080	AIG	F
25. FPB	22	vaginal	40 5/7	3.845	AIG	F
26. JPB	18	vaginal	39 6/7	3.570	AIG	F
27. CSN	25	vaginal	39	3.295	AIG	M

Parturientes	Idade M (anos)	Parto	Id gest (semanas)	Peso RN (gramas)	Classificação	Sexo RN
28. MSO	26	vaginal	38 3/7	3.070	AIG	F
29. MECS	38	cesárea	39 5/7	3.185	AIG	M
30. MPSB	37	cesárea	41 3/7	3.475	AIG	F
31. FGR	29	vaginal	37 2/7	3.650	AIG	M
32. RAM	39	cesárea	36	2.385	AIG	F
33. ANS	23	cesárea	40 6/7	3.326	AIG	F
34. EJS	26	vaginal	38 1/7	3.220	AIG	F
35. NS	20	vaginal	38 4/7	3.360	AIG	F
36. SAS	22	cesárea	39	3.326	AIG	M
37. SM	24	vaginal	39 5/7	3.170	AIG	F
38. FML	18	vaginal	39 3/7	3.140	AIG	M
39. DON	18	vaginal	38 6/7	3.010	AIG	M
40. DV	27	vaginal	39	3.326	AIG	F

Idade M: Idade da mãe; Id gest: Idade gestacional; RN: recém-nascido; AIG: Adequado para a idade gestacional; PIG: Pequeno para a idade gestacional; GIG: Grande para a idade gestacional; M: Masculino; F: Feminino.

Anexo B. Níveis e taxas de transferência de anticorpos IgG totais e específicos nas amostras de soro materno e de seus respectivos recém-nascidos a termo e níveis de anticorpos IgA totais e específicos nas amostras de soro e colostro materno.

Parturiente	Imunoglobulinas totais				Anticorpos anti- <i>B. pertussis</i> (Título)				
	IgG (mg/dl)			IgA (g/l) Colostro	IgG			IgA	
	Soro mãe	Soro RN	T (%)		Soro mãe	Soro RN	T (%)	Soro mãe	Colostro
1. PV	1024,6	1068,0	104	3,4	1:40	1:486	1215	1:5	1:60
2. RMS	1268,1	1400,8	110	6,4	1:588	1:687	117	1:25	1:211
3. MNPO	738,8	1400,8	190	3,7	1:315	1:381	121	1:19	1:70
4. JS	936,7	805,4	86	5,1	1:318	1:205	64	1:22	1:16
5. SFM	445,8	534,0	120	4,7	1:265	1:316	119	1:20	1:54
6. ED	986,6	1255,6	127	14,2	1:442	1:491	111	1:14	1:186
7. EAGP	588,2	662,9	113	11,0	1:115	1:169	147	1:8	1:82
8. EBC	513,0	662,9	129	12,9	1:144	1:214	149	1:15	1:122
9. DSS	439,2	662,9	151	16,0	1:86	1:88	102	1:4	1:211
10. CSC	920,4	919,8	100	21,0	1:340	1:107	31	1:101	1:875
11. RMDC	407,3	1068,0	262	5,0	1:164	1:358	218	1:3	1:67
12. LES	574,7	840,8	146	8,9	1:217	1:303	140	1:23	1:104
13. RMSA	759,5	1068,0	141	2,5	1:52	1:98	188	1:4	1:54
14. CACS	822,1	840,8	102	9,6	1:42	1:51	121	1:3	1:206
15. LVS	829,1	922,0	111	39,8	1:226	1:307	136	1:14	1:320
16. SAG	1097,9	948,1	86	3,8	1:353	1:273	77	1:21	1:24
17. SRCS	596,7	1068,0	179	4,0	1:154	1:317	206	1:23	1:26
18. VRV	948,9	760,4	80	5,9	1:647	1:622	96	1:14	1:48
19. ELC	1490,1	1907,6	128	5,4	1:223	1:193	86	1:11	1:56
20. FB	1228,5	1161,7	95	12,0	1:360	1:280	78	1:35	1:20
21. CAK	587,6	960,6	163	9,0	1:107	1:257	240	1:17	1:22
22. PAMC	1183,6	1161,7	98	0,000006	1:186	1:257	138	0	0
23. AMC	492,1	906,8	184	3,1	1:105	1:182	173	1:5	1:74
24. FOB	492,1	960,6	195	18,6	1:36	1:75	208	1:5	1:98

Parturiente	Imunoglobulinas totais				Anticorpos anti- <i>B. pertussis</i> (Título)				
	IgG (mg/dl)			IgA (g/l)	IgG			IgA	
	Soro mãe	Soro RN	T (%)		Soro mãe	Soro RN	T (%)	Soro mãe	Colostro
25. FPB	516,1	764,9	148	6,3	1:79	1:91	115	1:2	1:61
26. JPB	818,2	1353,5	165	4,1	1:111	1:220	198	1:5	1:14
27. CSN	720,4	1271,7	176	4,3	1:254	1:284	112	1:29	1:62
28. MSO	1611,9	1749,1	108	5,3	1:1898	1:1639	86	1:21	1:73
29. MECS	683,2	1163,3	170	4,2	1:89	1:144	162	1:21	1:18
30. MPSB	546,9	633,2	116	21,3	1:284	1:257	90	1:5	1:248
31. FGR	558,2	544,0	97	11,9	1:256	1:154	60	1:6	1:82
32. RAM	438,5	670,7	153	20,2	1:72	1:84	117	1:7	1:233
33. ANS	693,8	534,0	77	8,3	1:567	1:408	72	1:42	1:113
34. EJS	532,6	534,0	100	17,0	1:647	1:605	93	1:2	1:250
35. NS	454,5	713,5	157	17,3	1:285	1:379	133	1:27	1:172
36. SAS	682,6	1208,2	177	4,3	1:263	1:299	114	1:31	1:65
37. SM	452,6	1068,0	236	45,5	1:335	1:368	110	1:3	1:176
38. FML	1039,1	1963,5	189	3,2	1:122	1:218	179	1:5	1:14
39. DON	1053,0	1068,0	101	10,3	1:1556	1:1192	77	1:25	1:103
40. DV	546,7	849,2	155	19,1	1:54	1:82	152	1:24	1:105

RN: recém-nascido; T: taxa de transferência.

Anexo C. Reagentes

REAGENTES PARA ELISA

Tampão carbonato bicarbonato

Bicarbonato de sódio (S-6297, Sigma)

Carbonato de sódio anidro (6392, Merck) 0,923 g

Água destilada q.s.p. 1.000 ml

Acertar o pH para 9,0. Guardar a 4°C ou estocar a -20°C.

Tampão citrato fosfato

Ácido cítrico (C-0706, Sigma) 7,4 g

Fosfato de sódio bibásico anidro (F1033.01.AG, Synth) 9,94 g

Água destilada q.s.p. 1.000 ml

Acertar o pH para 5,0. Guardar a 4°C ou estocar a -20°C.

Tampão PBS 20 vezes concentrado

Fosfato de sódio (18008, CAAL) 13,84 g

Fosfato de sódio bibásico anidro (F1033.01.AG, Synth) 42,4 g

Cloreto de sódio (C1060.01.AH, Synth) 340 g

Água destilada 2.000 ml

Acertar o pH para 7,0. Guardar a 4°C ou estocar a -20°C.

Tampão PBS pH 7,4

Tampão PBS 20 vezes concentrado	50 ml
Água destilada q.s.p.	950 ml
Acertar o pH para 7,4. Guardar a 4°C.	

Tampão PBS NaCl Tween-20

Cloreto de sódio (C1060.01.AH, Synth)	20,5 g
Tween 20 (P5927, Sigma)	2 ml
Tampão PBS 20 vezes concentrado	50 ml
Água destilada	950 ml

Tampão de lavagem PBS Tween-20

Tween 20 (P5927, Sigma)	1 ml
Tampão PBS 20 vezes concentrado	50 ml
Água destilada	950 ml

Tampão para bloqueio

Leite Molico®	1 g
PBS pH 7,4	100 ml

Tampão para diluição das amostras e do conjugado

Leite Molico®	10 g
Tampão PBS NaCl Tween-20	100 ml

Ácido sulfúrico

Ácido sulfúrico (Quimex)	30 ml
--------------------------	-------

Água destilada	402 ml
----------------	--------

Adicionar o ácido sulfúrico cuidadosamente aos poucos na água destilada.

Guardar a temperatura ambiente.

Solução de substrato com ortofenilenodiamina

O-Phenylenediamine Dihydrochloride (P 8287, Sigma)	10 mg
--	-------

Tampão citrato fosfato	25 ml
------------------------	-------

Perhydrol 30% (Merck)	
-----------------------	--

REAGENTES PARA IMUNODIFUSÃO RADIAL QUANTITATIVA (IDRQ)

Agarose	1 g
---------	-----

PBS pH 7,4	100 ml
------------	--------

Aquecer até sua fusão, em banho-maria, e a seguir transferir para banho a 56°C até estabilização da temperatura. Para cada 6 ml de agarose 1%, é colocado 18 µl de anti-IgG humano desenvolvido em carneiro (I1011, Sigma, USA), e essa solução é transferida para placas de vidro, separadas por um espaçador. Após a solidificação, a agarose é perfurada e as amostras aplicadas. A seguir, são incubadas em câmara úmida por 72 horas a 4°C. Após este período medir os diâmetros dos halos de precipitação e construir um gráfico para obtenção dos resultados através da curva padrão. Como

padrão é utilizado soro padrão Beckman Coulter™ nas concentrações de 2.385 a 37,26 mg/dl para a obtenção da curva padrão.

REAGENTES PARA SDS-PAGE

Solução de SDS 10%

Sodium dodecyl sulfate (161-0301, BioRad)	10 g
---	------

Água destilada e desmineralizada q.s.p.	100 ml
---	--------

Dissolver o SDS em água destilada agitando gentilmente. Completar o volume de 100 ml com água destilada. Conservar a temperatura ambiente.

Solução de acrilamida 30%

Acrilamida (62021, Riedel-deHaën)	30 g
-----------------------------------	------

N,N'-methylene-bis-acrylamide (M 7256, Sigma)	0,8 g
---	-------

Água destilada e desmineralizada q.s.p.	100 ml
---	--------

Dissolver a acrilamida e a bis-acrilamida em 50 ml de água destilada, em banho-maria. Completar o volume de 100 ml. Filtrar em papel de filtro Whatman nº 1. Colocar em frasco escuro e conservar a 4°C até 30 dias.

Tampão Tris-HCl pH 8,8 1,5M

Trizma base (T 1503, Sigma)	27,25 g
-----------------------------	---------

Água destilada e desmineralizada q.s.p.	150 ml
---	--------

Dissolver o Tris-base em 80 ml de água destilada. Ajustar o pH para 8,8 com HCL 5M. Completar o volume de 150 ml com água destilada.

Tampão Tris-HCl pH 6,8 0,5M

Trizma base (T 1503, Sigma)	6 g
Água destilada e desmineralizada	100 ml

Dissolver o Tris-base em 60 ml de água destilada. Ajustar o pH para 6,8 com HCL 5M. Completar o volume de 100 ml com água destilada.

Solução D

Trizma base (T 1503, Sigma)	6,06 g
Solução de SDS 20%	2 ml
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	100 ml

Ajustar o pH para 6,8 com HCl 6N.

Solução a 10% de persulfato de amônio

Persulfato de amônio (31117, Riedel-deHaën)	0,2 g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	2 ml

Dissolver o persulfato de amônio em 2 ml de água destilada. Preparar na hora do uso. (Pode ser conservado em a -20°C por um tempo. Assim, nunca reparar volume maior que 2 ml. Aliquotar em *eppendorf*. Quando descongelar uma alíquota, desprezar a sobra).

Tampão de corrida pH 8,3 (Solução estoque, 5 vezes concentrado)

Trizma base (1503, Sigma T)	15 g
L-Glicina (Ajinomoto)	72 g
Sodium dodecyl sulfato (161-0301, BioRad)	5 g

Água destilada q.s.p.

1.000 ml

Dissolver os reagentes, sob agitação, na ordem acima. Ajustar o pH para 8,3 e guardar a 4°C. No momento do uso diluir 1:5 em água destilada.

Preparo do gel de acrilamida

Montar um sanduíche de placas de vidro perfeitamente limpas e com os espaçadores bem ajustados, testando com água para verificar se não há vazamentos. Colocar o gel preparado na concentração desejada, segundo os exemplos da tabela, nesta ordem:

Gel de Corrida 12,5% (quantidade para 2 placas)	
H ₂ O destilada	3,35 ml
Solução acrilamida 30%	4,15 ml
Tampão Tris-HCL-pH 8.8 1,5 M	2,00 ml
Glicerol	0,50 ml
SDS 10%	100 µl
TEMED	6 µl
Persulfato de amônio 10%	55 µl

TEMED= N,N,N',N'-tetra-methylethylenediamine (BioRad 161-0801)

Após polimerização do gel de corrida, colocar gel de aplicação de amostra (Gel Stacking), preparado na proporção:

Gel stacking (quantidade para 2 placas)	
Água destilada	3,75 ml
Solução de acrilamida	630 µl
Tampão Tris-HCL pH 6.8 0,5 M	630 µl
SDS 10%	50 µl
TEMED	5 µl
Persulfato de amônio 10%	40 µl

Colocar cuidadosamente o pente, que será retirado após a polimerização para aplicação das amostras e do padrão de peso molecular (Calibration kit for molecular weight determination, Pharmacia). Correr o gel a 100V.

Tampão de amostra

Solução D	2,5 ml
Solução de SDS 20%	2,5 ml
Glicerol 99% (13487-2, Aldrich)	2,0 ml
EDTA 0,1M (E 6758, Sigma)	0,1 ml
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	18,5 ml

Solução de azul de bromofenol

Azul de bromofenol (161-0404, BioRad)	2 g
Água destilada	100 ml

Preparo do extrato bruto de baterias não reduzidas

Solução da cepa 137 de *Bordetella pertussis* inativada (NIH, Bethesda, Maryland) 100 µl

Solução de azul de bromofenol 2 µl

Aquecimento à 60°C em banho-seco por 15 minutos, resultando em um extrato bacteriano com proteínas não reduzidas. Estocar a -20°C até o momento do uso.

COLORAÇÃO COM COOMASSIE BLUE

Solução Descorante

Metanol (21566, Merck) 100 ml

Ácido acético glacial (Reagen) 70 ml

Água destilada e desmineralizada 830 ml

Após a corrida eletroforética, desmontar o sanduíche de placas, retirar cuidadosamente com uma espátula o gel de aplicação da amostra e colocar o gel de corrida em cuba de vidro contendo solução fixadora. Deixar em agitação por pelo menos 30 minutos. Retirar a solução fixadora, colocar o corante e deixar em agitação por pelo menos 30 minutos. Retirar o corante e colocar a solução descorante. Deixar em agitação, trocando várias vezes o descorante até clareamento do fundo e evidenciação das bandas.

REAGENTES PARA IMMUNOBLOTTING

Tampão de Transferência

Trizma base (T 1503, Sigma)	3,03 g
Glicina (Ajinomoto)	14,41 g
Metanol (21566, Merck)	200 ml
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

Corante de Ponceau Para Nitrocelulose

Ponceau S (Gurr's)	0,5 g
Ácido acético glacial (Reagen)	1 ml
Água destilada q.s.p.	100 ml

Tampão Tris-Salina 0,1M pH7,4

Trizma base (T 1503, Sigma)	24,20 g
Cloreto de sódio (Reagen)	29,22 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

Acertar o pH para 7,4 com HCl.

Tampão Tris-Salina 0,01M pH7,4

Tampão Tris-salina 0,1M	100 ml
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

Tampão de Bloqueio

Tampão Tris-salina 0,01M	100 ml
Leite Molico®	5 g

Tampão de Diluição de Amostras e Conjugado

Tampão Tris salina 0,01M	100 ml
Leite Molico®	5 g
Tween 20 (P 5927, Sigma)	0,05 ml

Tampão de Lavagem

Tampão Tris salina 0,01M	1.000 ml
Tween 20 (P 1379, Sigma)	1 ml

Tampão Tris 0,05M

Tampão Tris-salina 0,1M	10 ml
Água destilada q.s.p.	30 ml

Substrato com Diaminobenzidina

3,3'-Diaminobenzidina (D 5637, Sigma)	20 mg
Tampão Tris 0,05M	40 ml
Perhidrol 30% (7209, Merck)	100 µl

RELAÇÃO DE EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- ❖ Agitador horizontal Kline, modelo 108, Nova Ética, Brasil.
- ❖ Centrífuga refrigerada de mesa, modelo RT 6000B, Sorval® Instruments.
- ❖ Centrífuga refrigerada de mesa para tubos tipo *Eppendorf*, modelo 5403, Eppendorf.
- ❖ Equipamento para filtração de água, modelo Milli-Q, Millipore, USA.
- ❖ Estufa, modelo 4101, Nova Ética, São Paulo, Brasil.
- ❖ Fluxo laminar, modelo VLFS12, Veco, Campinas, Brasil.
- ❖ Freezer -70°C, modelo 8425 SB-E, Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA.
- ❖ Lavadora de placas de ELISA, modelo Denley, Labsystem, Finlândia.
- ❖ Leitor de ELISA, Labsystem Multiskan MS, Labsystem, Finlândia.
- ❖ Miniprotean e Power Supply, modelo 1000/500, BioRad, USA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams J, Kimball A, Adams F. Early immunization against pertussis. *Am J Dis Child*. 1947;74:10-8.

Altunaiji S, Kukuruzovic R, Curtis N, Massie J. Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;3:CD004404.

Andrews R, Herceg A, Roberts C. Pertussis notifications in Australia, 1991 to 1997. *Commun Dis Intell*. 1997;21:145-8.

Ashworth LA, Fitzgeorge RB, Irons LI, Morgan CP, Robinson A. Rabbit nasopharyngeal colonization by *Bordetella pertussis*: the effects of immunization on clearance and on serum and nasal antibody levels. *J Hyg*. 1982;88:475-86.

Ausiello CM, Urbani F, Ia Sala A, Lande R, Cassone A. Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infect Immun*. 1997;65:2168-74.

Baptista PN, Magalhães V, Rodrigues LC, Rocha MA, Pimentel AM. Sources of infection in household transmission of culture-confirmed pertussis in Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24:1027-8.

Barnard A, Mahon BP, Watkins J, Redhead K, Mills KHG. Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to *Bordetella pertussis*: variables in the *in vivo* priming and *in vitro* cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0. *Immunology*. 1996;87:372-80.

Baron S, Njamkepo E, Grimprel E, Begue P, Desenclos JC, Drucker J, Guiso N. Epidemiology of pertussis in French hospitals in 1993 and 1994: thirty years after a routine use of vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17:412-8.

Belloni C, De Silvestri A, Tinelli C, Avanzini MA, Marconi M, Strano F, Rondini G, Chirico G. Immunogenicity of a three-component acellular pertussis vaccine administered at birth. *Pediatrics*. 2003;111:1042-5.

Bernt KM, Walker WA. Human milk as a carrier of biochemical messages. *Acta Paediatr Suppl*. 1999;430:27-41.

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

Brambell FW, Hemmings WA, McCarthy EF, Kerkwick RA. The passage into the embryonic yolk-sac cavity of maternal plasma protein in rabbits. *J Physiol*. 1949;108:177-85.

Brandtzaeg P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS*. 1995;103:1-19.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Programa Nacional de Imunizações – 30 anos*. Brasília: Ministério da Saúde. 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Doenças infecciosas e parasitárias - guia de bolso*. 5ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2005a. p. 81-4.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2005b. p. 213-4

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual dos centros de referência para imunobiológicos especiais*. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2006.

Bruss JB, Siber GR. Protective effects of pertussis immunoglobulin (P-IGIV) in the aerosol challenge model. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6:464-70.

Carbonare SB, Carneiro-Sampaio MMS. Composição do Leite Humano - Aspectos Imunológicos. In: Rego JD, editor. *Aleitamento Materno*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2006;103-20.

Carbonare SB, Silva MLM, Palmeira P, Carneiro-Sampaio MMS. Human colostrum IgA antibodies reacting to enteropathogenic *Escherichia coli*

antigens and their persistence in the faeces of a breastfed infant. *J Diarrhoeal Dis Res*. 1997;15:53-8.

Caro V, Bouchez V, Guiso N, Gatti B, Agosti MR, Ayala SEG. Pertussis in Argentina and France. *Vaccine*. 2007;25:4335-9

Carvalho BT, 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;6:50-4.

Center for Disease Control and Prevention. Pertussis - United States, 2001-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005;54:1283-6.

Center for Disease Control and Prevention. Pertussis - United States, 1997-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51:73-6.

Cheers C, Gray DF. Macrophage behavior during the complaisant phase of murine pertussis. *Immunology*. 1969;17:875-87.

Cherry JD. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;25:361-2.

Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine*. 1998;16:1901-6.

Cherry JD, Grimprel E, Guiso N, Heininger U, Mertsola J. Defining pertussis epidemiology clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24:S25-S34.

Cherry JD, Heininger U. Pertussis and other *Bordetella* infections. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan S, editors. *Textbook of pediatric infectious diseases*. 5^a ed. Philadelphia: W B Saunders; 2004. p. 1588-608.

Cherry JD. Pertussis vaccines for adolescents and adults. *Pediatrics*. 2005;116:755-6.

Cohen P, Scadron SJ. The effects of active immunization of the mother upon the offspring. *J Pediatr*. 1946;29:609-19.

Cohen P, Scadron S. The placental transmission of protective antibodies against whooping cough. *JAMA*. 1943;121:656-62.

Correa S, Palmeira P, Carneiro-Sampaio MMS, Nishimura L, Guth BEC. Human colostrum contains IgA antibodies reactive to colonization factors I and II of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47:199-206.

Crowcroft NS, Stein C, Duclos P, Birmingham M. How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect Dis*. 2003;3:413-8.

de Carvalho AP, Pereira EM. Acellular pertussis vaccine for adolescents. *J Pediatr*. 2006;82:S15-24.

Decot V, Woerly G, Loyens M, Loiseau S, Quatannens B, Capron M, Dombrowicz D. Heterogeneity of expression of IgA receptors by human, mouse, and rat eosinophils. *J Immunol.* 2005;174:628-35.

Delneri MT, Carbonare SB, Silva MLM, Palmeira P, Carneiro-Sampaio MMS. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by colostrum and milk from mothers delivering low-birth-weight neonates. *Eur J Pediatr.* 1997;156:493-8.

de Melker HE, Schellekens JF, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rumke HC, Conynvan Spaendonck MA. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance data. *Emerg Infect Dis.* 2000;6:348-57.

de Moraes-Pinto MI, Iazzetti AV, Farhat CL. Transporte transplacentário de anticorpos: implicações na proteção do recém nascido e em estratégias de imunização. *Rev Paulista Pediatr.* 2001;9:87-92.

de Voer RM, van der Klis FR, Nooitgedagt JE, Versteegh FG, van Huisseling JC, van Rooijen DM, Sanders EA, Berbers GA. Seroprevalence and placental transportation of maternal antibodies specific for *Neisseria meningitidis* serogroup C, *Haemophilus influenzae* type B, diphtheria, tetanus, and pertussis. *Clin Infect Dis.* 2009;49:58-64.

Edwards KM, Decker MD, Mortimer EA. Pertussis vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editores. *Vaccines*. 3^a ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999. p. 293-344.

Elahi S, Buchanan RM, Babiuk LA, Gerdts V. Maternal immunity provides protection against pertussis in newborn piglets. *Infect Immun*. 2006;2619-27.

Elliott E, McIntyre P, Ridley G, Morris A, Massie J, McEniery J, Knight G. National study of infants hospitalized with pertussis in the acellular vaccine era. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:246-52.

Forsyth K, Tan T, von König CH, Caro JJ, Plotkin S. Potential strategies to reduce the burden of pertussis. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24:S69-S74.

Funnell SG, Robinson A. A novel adherence assay for *Bordetella pertussis* using tracheal organ cultures. *FEMS Microbiol Lett*. 1993;110:197-203.

Godfroid F, Denoel P, Poolman J. Are vaccination programs and isolate polymorphism linked to pertussis re-emergence. *Expert Rev Vaccines*. 2005;4:757-78.

Gonik B, Puder K S, Gonik N, Kruger M. Seroprevalence of *Bordetella pertussis* antibodies in mothers and their newborn infants. *Infect Dis Obstetr and Gynecol*. 2005;13:59-61.

Gorringe A, Ashworth LA, Irons LI, Robinson A. Effect of monoclonal antibodies on the adherence of *Bordetella pertussis* to Vero cells. *FEMS Microbiol Lett.* 1985;26:5-9.

Granstrom M, Olinder-Nielsen AM, Holmblå P, Mar A, Hanngren K. Specific immunoglobulin for treatment of whooping cough. *Lancet.* 1991;338:1230-3.

Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi AE, Anemona A, Ciofi degli Atti ML, Giammanco A, Panei P, Blackwelder WC, Klein DL, Wassilak SG. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N Engl J Med.* 1996;334:341-8.

Greenberg DP. Pertussis in adolescents increasing incidence brings attention to the need for booster immunization of adolescents. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24:721-8.

Grumach AS, Carmona RC, Lazarotti D, Ribeiro MA, Rozentraub RB, Racz ML, Weinberg A, Carneiro-Sampaio MM. Immunological factors in milk from Brazilian mothers delivering small-for-date term neonates. *Acta Paediatr.* 1993;82:284-90.

Güris D, Strebel PM, Bardenheier B, Brennan M, Tachdjian R, Finch E, Wharton M, Livengood JR. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis.* 1999;28:1230-7.

Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med*. 1996;334:349–55.

Hamosh M. Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin North Am*. 2001;48:1-19.

Hanson LA. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998;81:523-37.

Hanson LA, Telemo E. Immunobiology and epidemiology of breastfeeding in relation to prevention of infections from a global perspective. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. *Mucosal Immunology*. 2^a ed. Amsterdam: Academic Press; 1999. p. 1501-10.

Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005;54:1-40.

Healy CM, Munoz FM, Rench MA, Halasa NB, Edwards KM, Baker CJ. Prevalence of pertussis antibodies in maternal delivery, cord, and infant serum. *J Infect Dis*. 2004;190:335-40.

Hellwig SM, Hazenbos WL, van de Winkel JG, Mooi FR. Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999;26:203-7.

Hellwig SM, van Oirschot HF, Hazenbos WLW, van Spriel AB, Mooi FR, van de Winkel JGJ. Targeting to Fc γ receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis*. 2001b;183:871-9.

Hellwig SM, van Spriel AB, Schellekens JF, Mooi FR, van de Winkel JG. Immunoglobulin A-mediated protection against *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immunol*. 2001a;69:4846-50.

Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immunol*. 2001;69:1231-43.

Heikkinen E, Kallonen T, Saarinen L, Sara R, King AJ, Mooi FR, Soini JT, Mertsola J, He Q. Comparative genomics of *Bordetella pertussis* reveals progressive gene loss in Finnish strains. *PLoS One*. 2007;2:e904.

Heininger U. Recent progress in clinical and basic pertussis research. *Eur J Pediatr*. 2001;160:203-13.

He Q, Mäkinen J, Berbers G, Mooi FR, Viljanen MK, Arvilommi H, Mertsola J. *Bordetella pertussis* protein pertactina induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J Infect Dis*. 2003;187:1200-5.

Honorio-França AC, Carvalho MP, Isaac L, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MM. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. *Scand J Immunol.* 1997;46:59-66.

Islam SKN, Ahmed L, Md. Khan NI, Huque S, Begum A, Yunus ABM. Immune components (IgA, IgM, IgG, immune cells) of colostrum of Bangladeshi mothers. *Pediatr Int.* 2006;48:543-8.

Kendrick PL, Eldering G, Dixon MK, Misner J. Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine: a comparative series using the intracerebral route for challenge. *Am J Public Health.* 1947;37:803-10.

Kendrick P, Thompson M, Elderling G. Immunity response of mothers and babies to injections of pertussis vaccine during pregnancy. *Am J Dis Child.* 1945;70:25-8.

Knuf M, Schmitt HJ, Wolter J, Schuerman L, Jacquet JM, Kieninger D, Siegrist CA, Zepp F. Neonatal vaccination with an acellular pertussis vaccine accelerates the acquisition of pertussis antibodies in infants. *J Pediatr.* 2008;152:655-60.

Kowalzik F, Barbosa AP, Fernandes VR, Carvalho PR, Avila-Aguero ML, Goh DY, Goh A, de Miguel JG, Moraga F, Roca J, Campins M, Huang M, Quian J, Riley N, Beck D, Verstraeten T. Prospective multinational study of

pertussis infection in hospitalized infants and their household contacts.

Pediatr Infect Dis J. 2007;26:238-42.

Kristoffersen EK, Matre R. Co-localization of b 2-microglobulin and IgG in human placental syncytiotrophoblast. *Eur J Immunol.* 1996;26:505-7.

Kristoffersen EK, Ulvestad E, Veleder GA, Matre R. Fc γ receptor heterogeneity in the human placenta. *Scand J Immunol.* 1990;31:561-4.

Leef M, Elkins KL, Barbic J, Shahin RD. Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both B cells and CD4+ T cells for key functions other than specific antibody production. *J Exp Med.* 2000;191:1841-52.

Lemke H, Coutinho A, Lange H. Lamarckian inheritance by somatically acquired maternal IgG phenotypes. *Trends Immunol.* 2004;25:180-6.

Lichty J, Slavin B, Bradford WL. An attempt to increase resistance to pertussis in newborn infants by immunizing their mothers during pregnancy. *J Clin Invest.* 1938;17:613-21.

Locht C, Bertin P, Menozzi FD, Renauld G. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella spp.* *Mol Microbiol.* 1993;9:653-60.

Locht C. Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *Int Microbiol.* 1999;2:137-44.

Luz PM, Codeço CT, Werneck GL. The resurgence of pertussis in developed countries: a problem for Brazil as well? *Cad Saúde Pública*. 2003;19:1209-13.

Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*. 2008;1:11-22.

Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaides KH, Schneider H. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1996;36:248-55.

Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. 1965;2:235-54.

Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:326-82.

Mattoo S, Foreman-Wykert K, Cotter PA, Miller JF. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci*. 2001;6:E168-86.

Mikelova LK, Halperin SA, Scheifele D, Smith B, Ford-Jones E, Vaudry W, Jadavji T, Law B, Moore D, Members of the Immunization Monitoring Program-Active (IMPACT). Predictors of death in infants hospitalized with pertussis: a case-control study of 16 pertussis deaths in Canada. *J Pediatr*. 2003;143:576-81.

Mills KHG, Barnard A, Watkins J, Redhead K. Cell mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infect Immunol*. 1993;61:399-410.

Mills KHG, Brady M, Ryan E, Mahon BP. A respiratory challenge model for infection with *Bordetella pertussis*: application in the assessment of pertussis vaccine potency and in defining the mechanism of protective immunity. *Dev Biol Stand*. 1998a;95:31-41.

Mills KHG. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect*. 2001;3:655-77.

Mills KHG, Ryan M, Ryan E, Mahon BP. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1998b;66:594-602.

Mishulow L, Leifer L, Schlesinger SL, Berkey SR. Pertussis antibodies in pregnant women-protective, agglutinating, and complement-fixing antibodies before and after vaccination. *Am J Dis Child*. 1942;64:608-17.

Mooi FR, Greeff SC. The case for maternal vaccination against pertussis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:614-24.

Müller FMC, Hoppe JE, Wirsing von König CH. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2435-43.

Munoz JJ, Arai H, Cole RL. Mouse-protecting and histamine-sensitizing activities of pertussigen and fimbrial hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1981;32:243-50.

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

Nagao AT, Ramos OL, Pereira AB. Immunoassays of secretory IgA and secretory component. *Braz J Med Biol Res*. 1990;23:211-24.

National Center for Immunisation Research, Surveillance of Vaccine Preventable Diseases. Vaccine preventable diseases and vaccination coverage in Australia, 1999-2000. *Commun Dis Intell*. 2002;26:SI-SIII.

Ntezayabo B, De Serres G, Duval B. *B. pertussis* resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22:22-7.

Oda M, Cowell JL, Burstyn DG, Manclark CR. Protective activities of the filamentous hemagglutinin and the lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis* in mice. *J Infect Dis*. 1984;150:823-33.

Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, Hallander HO, Heijbel H. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component

acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet*. 1997;350:1569-77.

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

Palmeira P, Costa-Carvalho BT, Arslanian C, Pontes GN, Nagao AT, Carneiro-Sampaio MM. Transfer of antibodies across the placenta and in breast milk from mothers on intravenous immunoglobulin. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20:528-35.

Palmeira P, Ito LY, Arslanian C, Carneiro-Sampaio MMS. Passive immunity acquisition of maternal anti-enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 IgG antibodies by the newborn. *Eur J Pediatr*. 2007;166:413-9.

Pellini ACG, Ciccone FH, Carvalhanas TRMP, Sidi CSCJO. Investigação de casos de coqueluche na Direção Regional de Saúde XVIII – Ribeirão Preto, 2004/2005. *Bol Epidemiol Paulista*. 2005;16:2-8

Pittman M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis J*. 1984;3:467-86.

Redhead K. An assay of *Bordetella pertussis* adhesion to tissue-culture cells. *J Med Microbiol*. 1985;19:99-108.

Redhead K. Pertussis vaccines – old and new. In: Ala'Alden DAA, Hormaeche C, editores. *Molecular and Clinical Aspects of Vaccine Development*. New York: John Wiley & Sons Incorporation. 1995. p. 259-322.

Redhead K, Watkins J, Barnard A, Mills KHG. Effective immunization against *Bordetella pertussis* respiratory infection in mice is dependent on induction of cell mediated immunity. *Infect Immun*. 1993;61:3190-8.

Rodriguez ME, Hellwig SM, Hozbor DF, Leusen J, van der Pol WL, van de Winkel JG. Fc receptor-mediated immunity against *Bordetella pertussis*. *J Immunol*. 2001;167:6545-51.

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

Russel MW, Kilian M Lamm ME. Biological activities of IgA. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editores. *Mucosal Immunology*. 2^a ed. Amsterdam: Academic Press; 1999. p. 225-240.

Saji F, Koyama M, Matsuzaki N. Human placental Fc receptors. *Placenta*. 1994;15:453-66.

Samsami Dehaghani A, Doroudchi M, Ghaderi A. Placental transfer of tetanus-specific immunoglobulin G in Iranian mothers. *J Mat Fetal Neonatal Med*. 2003;14:147-50.

Shahid NS, Steinhoff MC, Hoque SS, Begum T, Thompson C, Siber GR. Serum, breast milk, and infant antibody after maternal immunisation with pneumococcal vaccine. *Lancet*. 1995;346:1252-7.

Shahin RD, Witvliet MH, Manclark CR. Mechanism of pertussis toxin B oligomer-mediated protection against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infect Immun*. 1990;58:4063-8.

Simondon F, Preziosi MP, Yam A, Kane CT, Chabirand L, Iteaman I, Sanden G, Mboup S, Hoffenbach A, Knudsen K, Guiso N, Wassilak S, Cadoz M. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine*. 1997;15:1606-12.

Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*. 2003;21:3365-9.

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

Smith C, Vyas H. Early infantile pertussis: increasingly prevalent and potentially fatal. *Eur J Pediatr*. 2000;159:898-900.

Steed LL, Akporiaye ET, Friedman RL. *Bordetella pertussis* induces respiratory burst activity in human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*. 1992;60:2101-5.

Steed LL, Setare M, Friedman RL. Intracellular survival of virulent *Bordetella pertussis* in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol.* 1991;50:321-30.

Storsaeter J, Blackwelder WC, Hallander HO. Pertussis antibodies, protection, and vaccine efficacy after household exposure. *Am J Dis Child.* 1992;146:167-72.

Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine.* 1998;16:1907-16.

Storsaeter J, Olin P. Relative efficacy of two acellular pertussis vaccines during three years of passive surveillance. *Vaccine.* 1992;10:142-4.

Takahashi T, Yoshida Y, Hatano S, Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yajima M, Kojima T, Kanno T, Yonekubo A, Yajima T, Kuwata T. Reactivity of secretory IgA antibodies in breast milk from 107 Japanese mothers to 20 environmental antigens. *Biol Neonate.* 2002;82:238-42.

Tan T, Trindale E, Skowroski D. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24:10-8.

Taranger J, Trollfors B, Lagergård T, Sundh V, Bryla DA, Schneerson R, Robbins JB. Correlation between pertussis toxin IgG antibodies in

postvaccination sera and subsequent protection against pertussis. *J Infect Dis.* 2000;181:1010-3.

Thorton CA, Vance SHG. The placenta: a portal of fetal allergen exposure. *Clin Exp Allergy.* 2002;32:1537-9.

Torvaldsen S, McIntyre PB. Effect of the preschool pertussis booster on national notifications of disease in Australia. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:956-9.

Towbin H, Staeklin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:4350-4.

Trollfors B, Taranger J, Lagergard T, Lind L, Sundh V, Zackrisson G, Lowe CU, Blackwelder W, Robbins JB. A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine. *N Engl J Med.* 1995;333:1045-50.

Tuomanen EI, Zapiain LA, Galvan P, Hewlett EL. Characterization of antibody inhibiting adherence of *Bordetella pertussis* to human respiratory epithelial cells. *J Clin Microbiol.* 1984;20:167-70.

van den Berg BM, Beekhuizen H, Mooi FR, van Furth R. Role of antibodies against *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to human bronchial epithelial cells. *Infect Immun.* 1999;67:1050-5.

Van Rie A, Hethcote H. Adolescent and adult pertussis vaccination: computer simulations of five new strategies. *Vaccine*. 2004;22:3154-65.

Van Savage J, Decker MD, Edwards KM, Sell SH, Karzon DT. Natural history of pertussis antibody in the infant and effect on vaccine response. *J Infect Dis*. 1990;161:487-92.

van't Wout J, Burnette WN, Mar VL, Rozdzinski E, Wright SD, Tuomanen EI. Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect Immun*. 1992;60:3303-8.

Vitek CR, Pascual FB, Baughman AL, Murphy TV. Increase in deaths from pertussis among young infants in the United States in the 1990s. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22:628-34.

Wassilak S, Roper M, Murphy T, Orenstein W. Tetanus toxoid. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 4^a ed. Philadelphia: WB Saunders; 2004. p. 745-81.

Weiss AA, Hewlett EL. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu Rev Microbiol*. 1986;40:661-86.

Weiss AA, Johnson FD, Burns DL. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:2970-4.

Wendelboe AM, Van Rie A, Salmaso S, Englund JA. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24:S58-61.

Wheeler JG, Simmons AL. Pertussis update. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24:829-30.

Wolfe DN, Kirimanjeswara GS, Goebel EM, Harvill ET. Comparative role of immunoglobulin A in protective immunity against the *Bordetellae*. *Infect Immun*. 2007;75:4416-22.

Wood N, McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev*. 2008;9:201-11;quiz 211-2.

Wood N, Quinn HC, McIntyre P, Elliot E. Pertussis in infants: preventing deaths and hospitalizations in the very young. *J Paediatr Child Health*. 2008;44:161-5.

World Health Organization. Pertussis vaccines - WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2005;80:31-9.

World Health Organization, disponível em:

http://www.who.int/immunization_monitoring/en/globalsummary/timeseries/tincidenceper.htm. acesso em 18 set 2009.

Ao
Departamento de Pediatria

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 19.09.07, tomou ciência da execução do Protocolo de Pesquisa nº **0784/07**, intitulado: " **AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA MATERNO-INFANTIL E CAPACIDADE PROTETORA DE ANTICORPOS SÉRICOS E SECRETORES DIRIGIDOS A BORDETELLA PERTUSSIS**".

No que tange sua parte empírica será desenvolvido no **HOSPITAL UNIVERSITÁRIO-HU-USP**, tendo seu Comitê de Ética aprovado o estudo em 17.08.07.

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Patrícia Palmeira**

Pesquisador Executante: **Camila Cristina Quinello Gomes de Faria**

CAPPesq, 19 de setembro de 2007.

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa**

São Paulo, 17 de agosto de 2007.

$\Pi^{mo(a)} \cdot S^{(a)}$.

Profa. Dra. Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio

Departamento de Pediatria

Faculdade de Medicina

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “*Avaliação e transferência materno-infantil e possível capacidade protetora de anticorpos séricos e secretores dirigidos a Bordetella Pertussis*” – **Co-Autor(es)**: Camila Cristina Quinello Gomes de Faria; Patrícia Palmeira; Dr. Wagner Quintílio; Dra. Vera C.B. Cainelli Gebara - **Registro CEP-HU/USP**: 762/07 – **SISNEP CAAE**: 0607.0.015.198-07

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 17 de agosto de 2007, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como, seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório está previsto para 17 de agosto de 2008.

Atenciosamente,

Dr. Murilo Alexandre Carmona
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
da Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - TÍTULO DA PESQUISA: AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA MATERNO-INFANTIL E POSSÍVEL CAPACIDADE PROTETORA DE ANTICORPOS SÉRICOS E SECRETORES DIRIGIDOS A BORDETELLA PERTUSSIS.

- Justificativa e objetivos da pesquisa:** Prezada Senhora, como já lhe foi falado a senhora apresenta produção de anticorpos no sangue e secreções que são importantes para a defesa do seu organismo e do organismo do seu filho contra as doenças. Esta proteção, será transmitida para seu filho através da passagem transplacentária, que consiste na transmissão de fatores de defesa durante a gravidez, e da amamentação, através da transmissão dos mesmos fatores pelo leite materno. Dessa forma, o seu filho será protegido contra bactérias, entre elas, a bactéria causadora da Coqueluche (tosse comprida). A Coqueluche é uma doença respiratória grave transmitida através de gotículas respiratórias, que causa tosse seca associada a um ou mais dos seguintes sintomas: tosse súbita incontrolável, com tossidas rápidas e curtas, guincho inspiratório, vômitos pós-tosse e, se não tratada adequadamente, pode ocasionar risco de vida. Por este motivo, será necessário a coleta de sangue materno e do cordão umbilical, e colostro para a realização de exames laboratoriais para avaliarmos a proteção transmitida para o seu filho contra esta doença. O sangue é colhido de uma veia sob a pele com seringas e agulhas descartáveis, usadas uma única vez, e em pequena quantidade. No local da picada da agulha poderá sentir um pouco de dor e, às vezes poderá ficar uma mancha roxa que depois de alguns dias sumirá sozinha. Do mesmo modo será colhido o sangue do cordão, porém, sem dor nem hematomas. A colheita do colostro será realizada por ordenha manual, sendo um processo indolor, apresentando incômodo ou não. Caso a senhora e seu filho(a) não queiram participar da pesquisa, você tem todo o direito de se recusar. Caso comece na pesquisa e depois deseje desistir, também estará garantido assistência médica para a sua criança.
- Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Será colhido sangue da mãe, do cordão umbilical e colostro da mãe para avaliar a transmissão passiva para o recém-nascido de anticorpos IgG e IgA reativos contra Bordetella pertussis através da passagem transplacentária e do aleitamento materno, respectivamente.

3. **Desconfortos e riscos esperados:** O desconforto ocasionado à senhora será pequeno. No local da picada da agulha poderá sentir um pouco de dor e, às vezes poderá ficar uma pequena mancha roxa que depois de alguns dias sumirá sozinha. A colheita do colostro será um processo indolor, apresentando incômodo ou não.
4. **Benefícios que poderão ser obtidos:** O benefício a ser obtido será um melhor conhecimento da proteção contra a doença e condutas que poderão beneficiar os pacientes evitando maiores riscos ao recém-nascido.

II - OBSERVAÇÃO:

- A senhora terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para diminuir eventuais dúvidas.
- A senhora terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
- A senhora terá total confidencialidade, sigilo e privacidade dos dados deste estudo.
- Disponibilidade de assistência, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa;
- Se for detectado, algum problema de saúde previamente ao início da pesquisa, a senhora será encaminhada ao Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento.
- Se houver intercorrência de saúde decorrente da pesquisa, a senhora será atendida no HU/USP segundo o critério de assistência do mesmo (hospital de atendimento secundário). Se houver necessidade de atendimento de maior complexidade, a encaminharemos ao SUS.
- A duração prevista da pesquisa é de dois (2) anos.

III - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

NOME DOS PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

Pesquisadora executante: Camila Cristina Quinello Gomes de Faria

Dra. Patricia Palmeira

Dr. Wagner Quintilio

Pesquisadora responsável: Profª Dra. Magda M. S. Carneiro-Sampaio

CEP-HU: Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3039-9457 ou 3039-9479 - E-mail: cep@hu.usp.br.

IV - INFORMAÇÕES DO PACIENTE:

NOME DO PACIENTE:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ~ F ~

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).....

V – ENCERRAMENTO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“DECLARO QUE, APÓS CONVENIENTEMENTE ESCLARECIDO PELO PESQUISADOR E TER ENTENDIDO O QUE ME FOI EXPLICADO, CONSINTO EM PARTICIPAR DO PRESENTE PROJETO DE PESQUISA.”

SÃO PAULO, DE DE 200.....

assinatura do paciente ou responsável legal

assinatura e carimbo do pesquisador

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da transferência materno-infantil e capacidade protetora de anticorpos séricos e secretores dirigidos a *Bordetella pertussis*, protocolo nº 402/07, sob a responsabilidade de Wagner Quintilio, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/10/2007.

São Paulo, 15 de outubro de 2007.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan