



ARTIGO ORIGINAL

Placental and colostral transfer of antibodies reactive with enteropathogenic *Escherichia coli* intimins  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$ <sup>☆,☆☆</sup>



Silvia P.N. Altman<sup>a,b</sup>, Milene Tino-De-Franco<sup>a</sup>, Cristiane B. Carbonare<sup>a</sup>,  
Patricia Palmeira<sup>c</sup> e Solange B. Carbonare<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Butantan, Laboratório de Imunogenética, São Paulo, SP, Brasil

<sup>b</sup> Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil

<sup>c</sup> Hospital das Clínicas, Instituto da Criança, Laboratório de Investigação Médica (LIM-36), São Paulo, SP, Brasil

Recebido em 21 de setembro de 2016; aceito em 29 de dezembro de 2016

KEYWORDS

Enteropathogenic  
*Escherichia coli*;  
Diarrheagenic  
*Escherichia coli*;  
Intimin;  
Maternally acquired  
immunity;  
Immunoglobulin G;  
Colostrum

Abstract

**Objective:** Intimins are protein adhesins of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) capable of inducing attachment and effacement lesions in enterocytes. Anti-intimin antibodies are important for the protection from EPEC and EHEC infections because these antibodies inhibit bacterial adhesion and impair the initial step of the pathogenesis. We studied the transfer of maternal anti-intimin antibodies from healthy Brazilian mothers to their newborns through the placenta and colostrum.

**Methods:** Serum immunoglobulin G (IgG) and secretory immunoglobulin A antibodies against conserved (cons) and variable regions of intimins  $\alpha$  ( $v\alpha$ ),  $\beta$  ( $v\beta$ ), and  $\gamma$  ( $v\gamma$ ) were analyzed using an enzyme linked-immunosorbent assay in the blood and colostrum from 45 healthy women as well as cord blood serum samples from their newborns.

**Results:** The concentrations of antibodies reactive with  $v\alpha$  intimin were significantly lower than those of anti- $v\gamma$  and anti-cons antibodies in the colostrum samples. IgG serum antibodies reactive with all the subtypes of intimins were transferred to the newborns, but the concentrations of anti-cons serum antibodies were significantly higher in mothers and newborns than concentrations of antibodies against variable regions. The patterns of IgG transfer from mothers to newborns were similar for all anti-intimin antibodies. These values are similar to the percentage transference of total IgG.

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.12.005>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Altman SP, Tino-De-Franco M, Carbonare CB, Palmeira P, Carbonare SB. Placental and colostral transfer of antibodies reactive with enteropathogenic *Escherichia coli* intimins  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$ . J Pediatr (Rio J). 2017;93:568–75.

<sup>☆☆</sup> Trabalho associado ao Instituto Butantã, São Paulo, SP, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [carbosal@usp.br](mailto:carbosal@usp.br) (S.B. Carbonare).

**PALAVRAS-CHAVE**

*Escherichia coli* enteropatogênica;  
*Escherichia coli* diarreio gênica;  
 Intimina;  
 Imunidade materna adquirida;  
 Imunoglobulina G;  
 Coloastro

**Conclusions:** Anti-intimin antibodies are transferred from mothers to newborns through the placenta, and reinforce the protection provided by breastfeeding against diarrheagenic *E. coli* infections.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Transferência placentária e colostrar de anticorpos reativos a *Escherichia coli* enteropatogênica com expressão das intiminas $\alpha$ , $\beta$ ou $\gamma$

**Resumo**

**Objetivo:** As intiminas são adesinas proteicas de *Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC) e entero-hemorrágicas (EHEC) capazes de induzir as lesões *attaching and effacing* nos enterócitos. Anticorpos anti-intiminas são importantes para a proteção contra infecções por EPEC e EHEC porque esses anticorpos inibem a adesão bacteriana e impedem o passo inicial do mecanismo patogênico dessas bactérias. Nós estudamos a transferência de anticorpos maternos anti-intiminas de mães brasileiras saudáveis para os seus recém-nascidos através da placenta e do colostro.

**Métodos:** Anticorpos séricos da classe IgG e secretórios da classe IgA (SIgA) reativos com as porções conservada (cons) e variáveis das intiminas  $\alpha$  ( $v\alpha$ ),  $\beta$  ( $v\beta$ ) e  $\gamma$  ( $v\gamma$ ) foram analisados pelo teste de ELISA no sangue e no colostro de 45 parturientes saudáveis e no sangue de cordão umbilical dos seus respectivos recém-nascidos.

**Resultados:** As concentrações de anticorpos reativos com intimina  $v\alpha$  foram significativamente mais baixas que as dos anticorpos anti- $v\gamma$  e anti-cons nas amostras de colostro. Anticorpos IgG séricos reativos com todas as intiminas foram transferidos para os recém-nascidos, mas as concentrações de anti-cons foram significativamente mais altas tanto nas mães como nos recém-nascidos do que os anticorpos reativos com as regiões variáveis das intiminas. O padrão de transferência de IgG das mães para os recém-nascidos foi muito semelhante para todos os anticorpos anti-intiminas. Os valores de porcentagem de transferência foram semelhantes à transferência de IgG total.

**Conclusões:** Anticorpos anti-intimina são transferidos das mães para os recém-nascidos pela placenta e corroboram a proteção contra infecções por *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC) conferida pelo aleitamento materno.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introdução**

No mundo em desenvolvimento, a morbidez e a mortalidade relacionadas a diarreia bacteriana pediátrica são, em grande parte, atribuídas à categoria diarreio gênica de *Escherichia coli* (DEC). Os recém-nascidos e neonatos de até um ano são especialmente vulneráveis à diarreia causada por DEC quando não foram amamentados.<sup>1</sup>

Estudos epidemiológicos entre crianças brasileiras revelaram a presença de cepas de DEC nas fezes não apenas de crianças com diarreia, mas também de crianças saudáveis. As formas típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC) de *E. coli* enteropatogênica são detectadas entre esses isolados de crianças em áreas rurais e regiões metropolitanas.<sup>2,3</sup> A *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) é um patógeno entérico que está genética e fenotipicamente associado à EPEC, porém é distinguível por sua produção de toxinas. Os dois tipos de cepas de bactérias produzem lesões *attaching and effacing* (A/E) na mucosa intestinal, resultam em contato íntimo das bactérias com a célula hospedeira. Esse fenômeno leva à fosforilação de proteínas, destruição da membrana

celular e expressão de genes bacterianos, agrupados em uma ilha genômica denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE).<sup>1</sup> Uma das proteínas mais importantes codificadas pela LEE é a intimina, uma proteína de membrana externa de 94 kDa envolvida na adesão íntima às células bacterianas. A molécula de intimina é composta de 939 resíduos de aminoácidos (aa) e tem duas regiões funcionais: a porção N-terminal, que é altamente conservada e inserida na membrana externa bacteriana, e a porção C-terminal 280 aa, que é variável e seus polimorfismos determinam os vários subtipos de intiminas.<sup>4,5</sup> Foram descritos pelo menos 27 subtipos de intimina, porém apenas poucos parecem causar doença em humanos. A prevalência dos subtipos de intiminas varia entre tEPEC, aEPEC e EHEC, em diferentes regiões geográficas e períodos, conforme mostrado por estudos epidemiológicos. As intiminas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  estavam entre os subtipos de intiminas prevalentes no Brasil no início de 2000.<sup>1,6-8</sup>

Alguns estudos identificaram anticorpos anti-intiminas no soro de crianças e adultos infectados por EPEC ou EHEC.<sup>9,10</sup> Identificamos anticorpos anti-intiminas no soro de adultos e crianças saudáveis,<sup>11-13</sup> bem como no colostro de mães

brasileiras saudáveis.<sup>14-18</sup> Achados semelhantes foram descritos com relação a mulheres americanas e mexicanas.<sup>19</sup> Entretanto, ainda não foi descrita a transferência de subtipos de anticorpos maternos reativos a intimina para recém-nascidos por meio da placenta.

Os anticorpos do colostro inibem a adesão bacteriana às células HEp-2 *in vitro* e os mesmos anticorpos anti-EPEC foram encontrados nas fezes de recém-nascidos amamentados com o colostro de suas mães,<sup>15</sup> apontaram para um possível mecanismo por meio do qual a amamentação confere proteção aos recém-nascidos contra infecções causadas por EPEC e EHEC.<sup>14,16,17</sup> Além disso, os anticorpos anti-intiminas secretores e séricos parecem inibir a adesão bacteriana a células cultivadas e proteger contra infecção,<sup>15,17,20-22</sup> assim a transferência de anticorpos anti-intiminas pode proteger o feto e o recém-nascido contra infecção. No presente estudo, investigamos a presença de anticorpos anti-intiminas no soro e no colostro de mães saudáveis e no cordão umbilical de seus recém-nascidos com o uso de proteínas purificadas obtidas de bactérias recombinantes que expressam as porções conservadas (cons) e variáveis das intiminas  $\alpha$  ( $v\alpha$ ),  $\beta$  ( $v\beta$ ) e  $\gamma$  ( $v\gamma$ ).<sup>4</sup> Ao medir simultaneamente as concentrações desses anticorpos nas amostras de soro obtidas das mães e bebês, avaliamos também sua possível transferência placentária.

## Material e métodos

### Amostras biológicas de seres humanos

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) e da Universidade de São Paulo, Brasil (número CEP 06/434); todos os procedimentos foram feitos de acordo com a declaração de Helsinque de 1964 e foi obtido o consentimento informado por escrito de todas as mães participantes.

As amostras foram obtidas no HIAE, hospital privado que atende famílias de nível socioeconômico médio/alto, de julho a outubro de 2006. Soro, colostro e plasma sanguíneo de cordão umbilical foram obtidos de 45 mães saudáveis e de seus recém-nascidos saudáveis, que corresponderam a 37 partos cesáreos. Os critérios de inclusão foram: mães saudáveis, sem quaisquer patologias registradas durante a gravidez ou trabalho de parto e com resultados negativos nos testes de sorologia para HIV, HTLV I/II, hepatite B e C, doença de Chagas, sífilis, toxoplasmose e citomegalovírus. Sangue materno e de cordão umbilical foi obtido imediatamente após o parto e foram coletadas amostras de colostro até 72 horas após o parto. Todas as mães tinham entre 22 e 36 anos (idade média 31,2), a gama total de imunoglobulina G (IgG) no soro foi de 508,8-1389,1 mg/dL (média de 800,3 mg/dL). As mães estavam todas bem nutridas, eram predominantemente primíparas, com nível de escolaridade e situação socioeconômica médios/altos, viviam em boas condições sanitárias na cidade de São Paulo. Os recém-nascidos estavam saudáveis, com peso adequado para a idade gestacional, 37 a 41 semanas (média de 38 semanas), pesavam entre 2.630 e 39.45 g (média de 3.298 g).

Um grupo de controle de colostro foi preparado com quantidades iguais de 20 amostras coletadas de mulheres saudáveis e um grupo de controle de soro foi preparado

com quantidades iguais de 100 amostras de sangue coletadas de doadores adultos saudáveis. A concentração total de imunoglobulina A secretora (SIgA) do grupo de colostro foi determinada por um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) com um padrão comercial (Sigma, EUA). Um grupo de soro com uma concentração conhecida de imunoglobulina G (IgG) foi usado como padrão. Amostras com baixas e altas concentrações de anticorpos foram incluídas em cada placa de ELISA como um controle interno do ensaio.

### Antígenos

As intiminas purificadas foram obtidas de culturas de bactérias recombinantes com expressão, cada, das porções conservadas e variáveis de intiminas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , conforme descrito anteriormente.<sup>18</sup> Resumidamente, as bactérias recombinantes de *E.coli* M15 transformadas com plasmídeos pFLV $\alpha$ , pFLV $\beta$ , pFLV $\gamma$  ou pFLcons foram analisadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmar a presença da inserção após clonagem do vetor plasmídico. Os fragmentos do gene *eae* que codifica a intimina foram sequenciados para comparação com as cepas padrão registradas no GenBank. A expressão da proteína foi induzida pela cultura das bactérias com isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo, seguida de extração em uma prensa francesa e centrifugação. As proteínas foram finalmente purificadas por cromatografia de adsorção por íons metálicos imobilizados (Ni) (Qiagen, EUA) e os produtos foram analisados por eletroforese em gel de poli(acrilamida de dodecilsulfato de sódio).

### Anticorpos anti-intiminas

As concentrações séricas anti-intiminas de IgG e IgA secretora (SIgA) foram determinadas por ELISA com base na técnica de Fomsgaard.<sup>23</sup> As concentrações de anticorpos anti-intiminas específicos foram determinadas em comparação às concentrações de IgG e IgA totais, conforme descrito.<sup>18</sup> Para padronização, metade de uma placa de ELISA de 96 poços de microtitulação recebeu anti-IgG como anticorpo de captura (2,5  $\mu$ g/mL) e a outra metade recebeu cada uma das intiminas purificadas obtidas de bactérias recombinantes que expressam cons,  $v\alpha$ ,  $v\beta$  e  $v\gamma$ <sup>4</sup> à mesma concentração (2.5  $\mu$ g/mL) e foram acrescentadas diluições séricas adequadas do grupo de controle de soro (com concentração total conhecida de IgG determinada por nefelometria) nos dois lados da placa. O ensaio foi desenvolvido com um conjugado anti-IgG. Foram determinados os valores de densidade óptica e a concentração de anticorpos anti-intiminas foi determinada com a comparação da curva padrão de IgG total. Esse procedimento padrão também foi feito para SIgA em um grupo de colostro. Então, as amostras individuais de soro e colostro em diluições séricas que iniciaram a partir de 1:10 foram analisadas nas placas de ELISA que receberam intiminas recombinantes e o grupo de soro e colostro foi usado para criar a curva padrão. Amostras com baixas e altas concentrações de anticorpos foram incluídas em cada placa como um controle interno. As concentrações de IgG total nas amostras de soro materno e cordão umbilical foram medidas por um ensaio imunoturbidimétrico (Abbott Diagnostics, EUA). Os percentuais de transferência

placentária dos anticorpos IgG total específicos para intiminas foram determinados em cada ensaio como segue:

$$\%T = \left( \frac{\text{concentração de anticorpos no soro de cordão umbilical}}{\text{concentração de anticorpos no soro materno}} \right) \times 100$$

## Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos a análise estatística, inclusive análises descritivas com gráficos de caixas, análise de variância (Anova) paramétrica com teste de comparação múltipla e teste de correlação de Spearman, em nível de confiança de 95%, com o *software* GraphPad Prism (Graph Pad Software Inc., EUA).

## Resultados

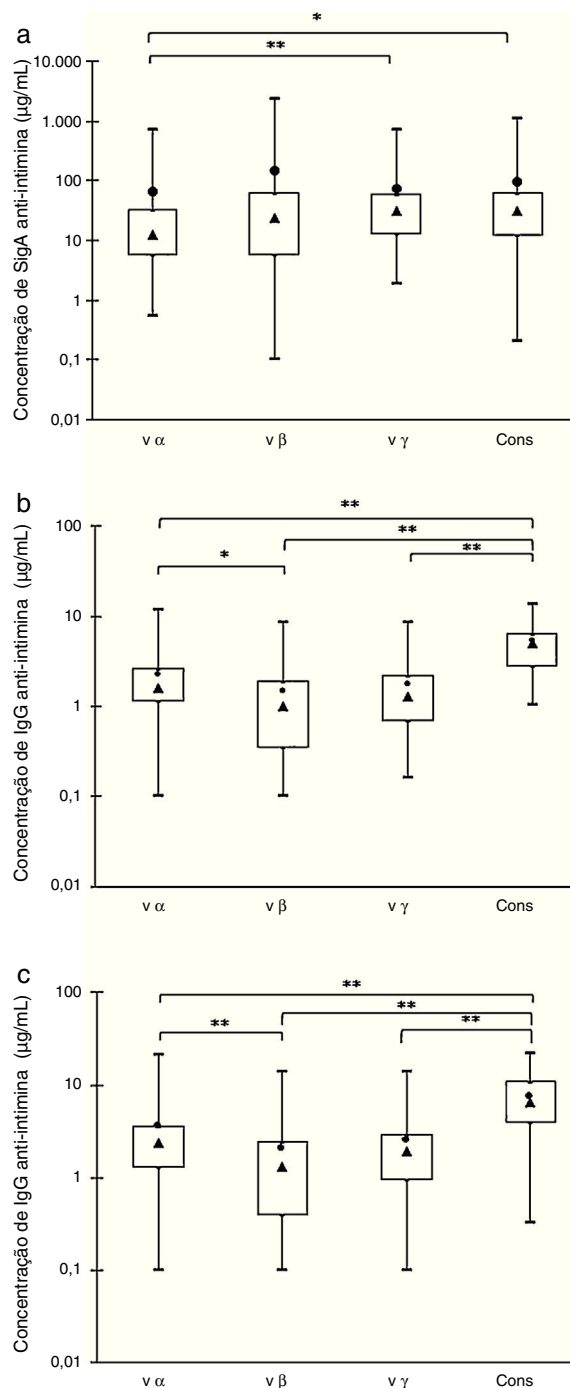
A **figura 1** mostra as concentrações de anticorpos reativos aos quatro antígenos recombinados purificados (cons,  $v\alpha$ ,  $v\beta$  e  $v\gamma$ ) presentes nas 45 amostras de colostro, 45 amostras de soro materno e 45 amostras de soro de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos. O gráfico de caixas mostra os valores máximos e mínimos, percentis de 25% e 75%, medianas e médias.

As análises das amostras de colostro pelo teste de Friedman para comparações múltiplas mostraram que as concentrações de anticorpos IgA anti- $v\alpha$  foram significativamente menores do que as de anti- $v\gamma$  e anti-cons, porém não houve diferenças estatisticamente significativas nos outros pares de valores (**fig. 1A**). As concentrações de anticorpos IgA variaram amplamente e as médias acima das medianas indicaram que não se tratou de uma distribuição normal.

A comparação de IgG específica revelou que a concentração de anti-cons foi significativamente maior em comparação com outros subtipos nas amostras de soro das mães e dos recém-nascidos. Os níveis de anticorpos anti- $v\alpha$  foram maiores do que os de anti- $v\beta$ , porém não houve diferenças significativas entre esses dois subtipos e anticorpos anti- $v\gamma$  (**fig. 1B e C**). Esses resultados foram confirmados pela análise de distribuição de frequência (dados não mostrados).

A **figura 2** mostra que a transferência de IgG de mães para recém-nascidos foi muito semelhante a todos os subtipos de anticorpos analisados. O percentual médio de transferência de anticorpos anti-intimina variou de 142% a 149% e as medianas variaram de 130% a 146%. Esses valores são semelhantes ao percentual de transferência de IgG total (média = 143%, mediana = 137%). Não houve diferenças significativas entre os percentuais de transferência de anticorpos reativos a vários subtipos de intiminas.

A **tabela 1** mostra os resultados dos testes de correlação de Spearman. Nas amostras de soro materno, houve uma correlação significativa entre os anticorpos anti- $v\alpha$  e anti- $v\beta$  ( $p < 0,0001$ ). Não houve correlação estatisticamente significativa entre  $v\gamma$  e cons. O mesmo padrão de correlação foi observado nas amostras de soro dos recém-nascidos. Os coeficientes de correlação foram altos em



**Figura 1** Distribuições das amostras em caixa por suas concentrações de anti-intimina: valores máximos e mínimos (linhas superiores e inferiores fora da caixa, respectivamente), média (●) e mediana (▲), quartil de 75% e 25% (linhas superiores e inferiores da caixa, respectivamente). (a) Anticorpos SIgA em amostras de colostro. (b) Anticorpos IgG em amostras de soro materno. (c) Anticorpos IgG em amostras de soro de recém-nascidos. Diferenças significativas \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

**Tabela 1** Coeficientes de correlação das concentrações de anticorpos anti-intimina nas amostras de soro (IgG) e colostro (SIgA) e percentual de transferência de IgG de mãe para recém-nascido, em pares de tipos de intimina

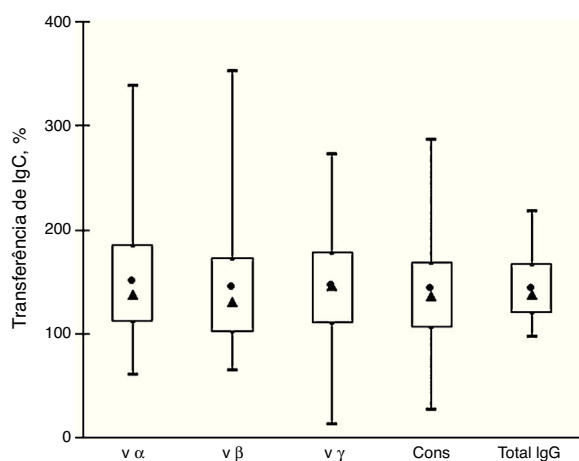
Anticorpos anti-intimina	Soro materno IgG	Soro de recém-nascidos IgG	Colostro SIgA	Transferência de IgG (%)
v $\alpha$ vs. v $\beta$	<b>0,8014</b> (0,0001)	<b>0,8132</b> (0,0001)	<b>0,8235</b> (0,0001)	0,3447 (0,0204)
v $\alpha$ vs. v $\gamma$	0,3590 (0,0154)	0,4586 (0,0015)	<b>0,7768</b> (0,0001)	0,4603 (0,0015)
v $\alpha$ vs. cons	0,3159 (0,0345)	<b>0,5995</b> (0,0001)	<b>0,7809</b> (0,0001)	0,3121 (0,0369)
v $\beta$ vs. v $\gamma$	0,4433 (0,0023)	0,5034 (0,0004)	<b>0,7232</b> (0,0001)	0,5306 (0,0002)
v $\beta$ vs. cons	0,3495 (0,0186)	0,4934 (0,0006)	<b>0,7111</b> (0,0001)	0,2462 (0,1031)
v $\gamma$ vs. cons	0,1043 (0,4954)	0,2221 (0,1426)	<b>0,7628</b> (0,0001)	0,3306 (0,0265)

v $\alpha$ , porção variável de intimina  $\alpha$ ; v $\beta$ , porção variável de intimina  $\beta$ ; v $\gamma$ , porção variável de intimina  $\gamma$ .

Os coeficientes foram determinados pelo teste de correlação de Spearman, nível de confiança de 95% (valores de p em itálico), p < 0,0001 destacado em negrito.

todos os pares analisados para verificação das amostras de colostro.

A **tabela 2** mostra coeficientes de correlação significativos para todos os tipos de intimina entre as amostras de soro materno e dos recém-nascidos, assim a transferência de anticorpos de mães para recém-nascidos foi igualmente eficiente para todos os subtipos de intimina. Foram vistos coeficientes de baixa correlação entre os anticorpos IgG sérica e SIgA do colostro, pois a geração de anticorpos IgG sérica e IgA secretora ocorre por meio de mecanismos independentes.



**Figura 2** Transferência de anticorpos IgG anti-intimina e IgG total de mães para recém-nascidos. Distribuição de amostras em caixa por seus percentuais de transferência de anti-v $\alpha$ , anti-v $\beta$ , anti-v $\gamma$  e anti-cons e transferência de IgG total: valores máximos e mínimos (linhas superiores e inferiores fora da caixa, respectivamente), média (●) e mediana (▲), quartis de 25% e (linhas superiores e inferiores da caixa, respectivamente).

**Tabela 2** Coeficientes de correlação de concentrações de anticorpos anti-intiminas entre as amostras de soro (IgG) materno e colostro (SIgA) e entre as amostras de soro materno e de cordão umbilical (IgG)

Intimina	Soro materno X colostro	Soro materno X Soro de recém-nascidos
v $\alpha$	0,0028 (0,9853)	<b>0,8727 (0,0001)</b>
v $\beta$	0,1475 (0,3337)	<b>0,9568 (0,0001)</b>
v $\gamma$	0,1743 (0,2578)	<b>0,9320 (0,0001)</b>
cons	0,2265 (0,1346)	<b>0,8519 (0,0001)</b>

cons, porção conservada de intimina; v $\alpha$ , porção variável de intimina  $\alpha$ ; v $\beta$ , porção variável de intimina  $\beta$ ; v $\gamma$ , porção variável de intimina  $\gamma$ .

Os coeficientes foram determinados pelo teste de correlação de Spearman, nível de confiança de 95% (valores de p em itálico), p < 0,0001 destacado em negrito.

## Discussão

Neste estudo, fornecemos uma comprovação da transferência placentária e colostrária de anticorpos anti-EPEC e anti-EHEC para recém-nascidos; esses anticorpos provavelmente conferem proteção para os neonatos contra diarreia causada por esses patógenos. Os anticorpos anti-intimina podem inibir a adesão bacteriana às células epiteliais e essa capacidade foi mostrada pelos anticorpos SIgA presentes no colostro e leite humano e nos

anticorpos do soro de humanos e animais imunizados.<sup>13-17,22,24</sup> Com base nisso, as intiminas foram propostas como uma possível candidata a vacina contra infecção por EPEC e EHEC.<sup>20,21</sup>

Foram encontrados anticorpos nas porções conservadas e variáveis de intiminas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  em todas as amostras de soro e colostro analisadas, provavelmente devido à ampla prevalência de EPEC em nossa população. Este estudo foi feito com amostras coletadas de mães de níveis socioeconômicos médios/altos. Demonstramos achados semelhantes quando analisamos amostras coletadas de mães de níveis socioeconômicos mais baixos e que moram em áreas com saneamento precário. Isso sugere que a prevalência da EPEC depende da situação socioeconômica ou das condições de higiene dos pacientes.<sup>11,12,16,18</sup> Achados semelhantes foram relatados por Araujo et al. com relação à detecção de DEC em amostras fecais de crianças de áreas urbanas pobres e crianças atendidas em serviços médicos privadas de alto nível socioeconômico.<sup>25</sup>

Crianças saudáveis brasileiras desenvolveram anticorpos reativos a fatores associados à virulência da EPEC, como intiminas.<sup>11</sup> No fim do primeiro ano de vida, esses neonatos mostram repertórios de anticorpos anti-EPEC no soro e na saliva equivalentes aos de adultos saudáveis na mesma população. As intiminas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  são compartilhadas por cepas de EPEC (típicas ou atípicas) e EHEC e estão presentes em DEC encontrada em animais domésticos e agrícolas que podem ter contato próximo com pessoas. Isso sugere que a intimina é um antígeno comum presente de forma ubíqua na população brasileira.<sup>26</sup>

Os subtipos de anticorpos anti-intiminas encontrados nas amostras analisadas neste estudo podem inibir a adesão bacteriana, pois essa porção da molécula das intiminas é responsável pelas interações com as células hospedeiras, destaca um papel na proteção contra as bactérias.<sup>22</sup>

A análise estatística da IgG detectada nas amostras de soro materno e de recém-nascidos revelou que as concentrações de anticorpos na porção conservada de intimina foram maiores em comparação com os anticorpos nas porções variáveis dos subtipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A região conservada é comum em todos os subtipos e, portanto, é razoável esperar que todas as pessoas desenvolvam esses anticorpos, independentemente do subtipo específico de intimina presente nas bactérias em contato. Resultados semelhantes foram observados por Zapata-Quintanilla et al.<sup>18</sup> em suas análises de amostras de soro de adultos saudáveis (doadores de sangue). Contudo, esse perfil foi diferente em amostras de colostro, nas quais a concentração de anticorpos reativos a  $v\beta$ ,  $v\gamma$ , e cons foi semelhante, porém a concentração de anticorpos anti- $v\alpha$  foi menor do que a de anti- $v\gamma$  e anti-cons. Esse padrão não foi visto por Zapata-Quintanilla et al.,<sup>18</sup> que encontraram menores níveis de anti- $v\gamma$ . Essa discrepância também pode ser atribuível à variação nos repertórios de anticorpos entre as mães, pois as amostras foram coletadas de doadores com diferentes características no estudo de Zapata-Quintanilla e no nosso: o nível socioeconômico (hospital público em comparação com hospital privado, respectivamente), idade (média de 24,6 em comparação com 31,2 anos), tipo de parto (24,4% em comparação com 82% de casos de parto cesáreo) e período de coleta de amostras (setembro de 1997 a fevereiro de 1998 em comparação

com julho a outubro de 2006). Os estudos epidemiológicos indicaram que a prevalência de intimina  $\gamma$  aumentou com o surgimento de aEPEC nos últimos anos.<sup>1,3,6-8,25</sup>

As intiminas são frequentemente encontradas em bactérias isoladas não apenas em pacientes com diarreia, mas também em pessoas saudáveis e animais domésticos.<sup>1,6,7,26</sup> A intimina  $\alpha$  foi detectada em cepas de tEPEC e aEPEC. A intimina  $\beta$  está associada a tEPEC e aEPEC, bem como a EHEC, ao passo que a intimina  $\gamma$  é encontrada em aEPEC e EHEC. O isolamento dessas cepas de bactérias no Brasil pode explicar a presença desses anticorpos nas amostras de soro e colostro. Apesar da baixa incidência de infecção por EHEC entre adultos brasileiros, os anticorpos anti-intimina  $\gamma$  estão presentes e mostram uma correlação positiva com os anticorpos reativos a outros subtipos de intiminas. O aumento nas frequências de cepas de aEPEC no meio ambiente pode ser responsável pela presença de anticorpos anti-intimina  $\gamma$  entre brasileiros saudáveis. Estudos recentes mostram subtipos de intiminas  $\beta$  e  $\gamma$  na indução da diarreia em humanos e o subtipo  $\beta$  parece ser significativamente mais frequente em casos de doenças em comparação com portadores saudáveis.<sup>8</sup>

Há uma correlação significativa entre a concentração de anticorpos IgG anti-intimina  $\alpha$  e  $\beta$  no soro materno e no soro de recém-nascidos, que pode ser devido a uma reação cruzada entre os anticorpos IgG com vistas a essas intiminas. De fato, as sequências genéticas das porções variáveis dessas intiminas têm uma homologia de 65%,<sup>18</sup> que explica a presença de anticorpos de reação cruzada. Portanto, esse fenômeno mostra que independentemente do subtipo de intimina candidato a vacina, esse subtipo pode aumentar anticorpos específicos, mas também pode induzir anticorpos de reação cruzada direcionados ao outro subtipo.

As concentrações de anticorpos SIgA reativos a todos os tipos de intiminas presentes nas amostras de colostro mostraram coeficientes de correlação significativos, sugeriram que há certo grau de reação cruzada entre esses anticorpos. Essa situação pode ser explicada pela homologia elevada entre as moléculas de intimina e pela menor especificidade de anticorpos SIgA no colostro em comparação com a IgG no soro. Contudo, as maiores concentrações de anticorpos anti-intimina nas amostras de colostro em comparação com as amostras de soro corroboram o papel essencial da amamentação na proteção de neonatos contra infecção por DEC. Em humanos, os anticorpos SIgA no leite não são absorvidos de forma significativa pela mucosa do bebê amamentado, mas agem como defesa local. Em um estudo anterior, mostramos, por meio de imunotransferência, a mesma reatividade dos anticorpos SIgA anti-EPEC nas amostras de colostro que a reatividade de anticorpos anti-EPEC nas fezes dos respectivos bebês. Além disso, os anticorpos SIgA isolados de colostro por cromatografia de afinidade inibem a adesão da EPEC às células HEP-2.<sup>15</sup>

Nossos resultados indicam que diferentes anticorpos anti-intimina são transferidos de mães para recém-nascidos com igual eficiência por meio da placenta. Esses resultados sustentam a ideia de que, nesse caso, a transferência materna-fetal não é influenciada pela especificidade do anticorpo. Neste estudo, os percentuais de transferência dos anticorpos anti-intimina são equivalentes ao percentual de transferência de IgG total, que é  $\sim 140\%$ . Achados semelhantes foram relatados por outros autores.<sup>27,28</sup>

Apesar de haver uma alta frequência de casos isolados de DEC no Brasil, as cepas de EHEC não são tão comuns quanto em outros países. Podemos supor que, além das características ambientais, como clima e hábitos alimentares, as pessoas podem desenvolver imunidade contra EHEC resultante de contato com outras cepas (por exemplo, DEC). Alguns estudos revelaram a presença de anticorpos reativos a vários sorotipos de lipopolissacarídeos (LPS), como O111, O55, O157 e O26, em amostras de soro e colostro de brasileiras saudáveis.<sup>12,13</sup> Outros estudos mostraram a transferência maternal-fetal de anticorpos IgG reativos a O111, O16 e O6 LPS associados a sepse neonatal, bem como O157.<sup>29,30</sup> Esses antígenos LPS são comumente encontrados em diferentes patótipos de *E. coli* que são agentes de doenças intestinais ou sistêmicas. Como um todo, essas observações e este trabalho nos permitem concluir que a proteção contra EHEC pode ser conferida por contato com EPEC ou outras cepas de *E. coli*.

Nossos resultados confirmam que os anticorpos maternos reativos a intiminas são transferidos para os recém-nascidos por meio da placenta e que a presença de altas concentrações desses anticorpos no colostro corroboram o fator de proteção da amamentação.

## Financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp – 03/13250-3).

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Agradecimentos

A todas as mães por seu consentimento com relação à doação das amostras. À Maternidade, ao Banco de Leite e ao Laboratório de Criopreservação do Hospital Israelita Albert Einstein por sua ajuda com a coleta de amostras; à Divisão de Diagnósticos da Abbott no Brasil pela doação do Kit imunoturbidimétrico para análise de IgG; à Dra. Lucy B. Zapata-Quintanilla pela ajuda nos experimentos, a Rosana Prisco pela análise estatística e à Dra. Yanira Rizzo Vasquez pela revisão do manuscrito e pelas sugestões valiosas (Instituto de Ciências Farmacêuticas, King's College, Londres, Inglaterra).

## Referências

- Gomes TA, Elias WP, Scaletsky IC, Guth BE, Rodrigues JF, Piazza RM, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*. 2016;47:3–30.
- Lozer DM, Souza TB, Monfardini MV, Vicentini F, Kitagawa SS, Scaletsky IC, et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. *BMC Infect Dis*. 2013;13:418.
- Moreno AC, Filho AF, Gomes Tdo A, Ramos ST, Montemor LP, Tavares VC, et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;66:50–7.
- Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, et al. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol*. 1998;36:662–8.
- Adu-Bobie J, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MM, Dougan G, Frankel G. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin alpha and intimin beta from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1998;66:5643–9.
- Franco RT, Araújo LD, Penna FJ, Magalhães PP, Mendes EN. Intimin subtyping of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with and without diarrhea: a possible temporal shift in the distribution of intimin alleles. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74:81–3.
- Pitondo-Silva A, Nakazato G, Falcão JP, Irino K, Martinez R, Darini AL, et al. Phenotypic and genetic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal children in the Ribeirão Preto metropolitan area, São Paulo State, Brazil. *APMIS*. 2015;123:128–35.
- Hu J, Torres AG. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:729–34.
- Martinez MB, Taddei CR, Ruiz-Tagle A, Trabulsi LR, Girón JA. Antibody response of children with enteropathogenic *Escherichia coli* infection to the bundle-forming pilus and locus of enterocyte effacement-encoded virulence determinants. *J Infect Dis*. 1999;179:269–74.
- Voss E, Paton AW, Manning PA, Paton JC. Molecular analysis of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O111:H<sup>-</sup> proteins which react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome. *Infect Immun*. 1998;66:1467–72.
- Carbonare CB, Carbonare SB, Carneiro-Sampaio MM. Early acquisition of serum and saliva antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins by infants living in an endemic area. *Pediatr Allergy Immunol*. 2003;14:222–8.
- Palmeira P, Carbonare SB, Guth BE, Carbonare CB, Pontes GN, Tino-De-Franco M, et al. Acquisition of serum antibodies reactive with enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence-associated factors by healthy Brazilian children and adults. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:1089–94.
- Zapata-Quintanilla LB, Palmeira P, Tino-De-Franco M, Amaral JA, Carbonare CB, Carbonare SB. Systemic antibody response to diarrheagenic *Escherichia coli* and LPS O111, O157 and O55 in healthy Brazilian adults. *Scand J Immunol*. 2006;64:661–7.
- Camara LM, Carbonare SB, Silva ML, Carneiro-Sampaio MM. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to HeLa cells by human colostrum: detection of specific sIgA related to EPEC outer-membrane proteins. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;103:307–10.
- Carbonare SB, Silva ML, Palmeira P, Carneiro-Sampaio MM. 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.
- Delneri MT, Carbonare SB, Silva ML, Palmeira P, Carneiro-Sampaio MM. 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.
- Palmeira P, Carbonare SB, Amaral JA, Tino-De-Franco M, Carneiro-Sampaio MM. 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.
- Zapata-Quintanilla LB, Tino-De-Franco M, Nuñez SP, Carbonare CB, Vulcano AB, Carbonare SB. Seric and secretory antibodies reactive to alpha, beta and gamma intimins of *Escherichia coli* in healthy Brazilian adults. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;57:32–9.

19. Noguera-Obenza M, Ochoa TJ, Gomez HF, Guerrero ML, Herrera-Insua I, Morrow AL, et al. Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:545–51.
20. Dean-Nystrom EA, Gansheroff LJ, Mills M, Moon HW, O'Brien AD. Vaccination of pregnant dams with intimin (O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun.* 2002;70:2414–8.
21. Ferreira PC, Campos IB, Abe CM, Trabulsi LR, Elias WP, Ho PL, et al. Immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing intimin fragments produces antibodies able to inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to cultivated epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;54:245–54.
22. Gansheroff LJ, Wachtel MR, O'Brien AD. Decreased adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to HEp-2 cells in the presence of antibodies that recognize the C-terminal region of intimin. *Infect Immun.* 1999;67:6409–17.
23. Fomsgaard A. Antibodies to lipopolysaccharides: some diagnostic and protective aspects. *APMIS Suppl.* 1990;18:1–38.
24. Amaral JA, Tino De Franco M, Carneiro-Sampaio MM, Carbonare SB. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunised Leghorn chickens. *Res Vet Sci.* 2002;72:229–34.
25. Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KR, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CM, et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3396–9.
26. Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol.* 2007;115:297–306.
27. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:985646.
28. de Voer RM, van der Klis FR, Nooitgedagt JE, Versteegh FG, van Huisseling JC, van Rooijen DM, et al. 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.
29. Nagao AT, Martinez CC, Vieira VS, Takano OA, Costa-Carvalho BT, Carneiro-Sampaio MM. Placental transfer of IgG and IgG subclass antibodies anti-purified *Escherichia coli* LPS O16, O6 and O111. *Scand J Immunol.* 1998;47:609–14.
30. Palmeira P, Yu Ito L, Arslanian C, Carneiro-Sampaio MM. Passive immunity acquisition of maternal anti-enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 IgG antibodies by the newborn. *Eur J Pediatr.* 2007;166:413–9.