

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IMUNÓGENO CONJUGADO DE LIPOPOLISSACARÍDEO DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E ALBUMINA BOVINA

R.R. dos Santos¹, L.F. Caron¹, M.L.L. Gonçalves², M.R. Sierakowski³, C.E.O. Ferreira¹, L. Ono¹

¹Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Setor Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Laboratório de Microbiologia “Yasuyoshi Hayashi”, Rua Francisco H. dos Santos, s/nº, CEP 81530-090, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: lono@ufpr.br

RESUMO

A *Pseudomonas aeruginosa* é agente etiológico de infecções oportunistas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Suas características inerentes em desenvolver resistência aos mais variados tipos de antibacterianos a torna um ponto crítico no controle de infecções. Em animais, os problemas com multirresistência ocorrem principalmente em casos de otite, cistite, úveo-conjuntivite, endometrite e mastite, não havendo vacina comercialmente disponível. No intuito de melhorar a imunogenicidade desse antígeno, foi testada a técnica de conjugação do lipopolissacarídeo (LPS) de *P. aeruginosa* à albumina bovina (BSA) por aminação reductiva direta utilizando *m*-periodato de sódio. A conjugação foi avaliada por cromatografia de gel-permeação, dosando-se açúcar e proteína totais, e tanto o LPS quanto a BSA foram identificados em proporções semelhantes. A imunização de camundongos com a vacina conjugada LPS-BSA conferiu títulos de anticorpos aglutinantes contra *P. aeruginosa* inferiores aos obtidos com a mistura de LPS e BSA livres. Foram 65% e 86% menores na 6ª e na 10ª semanas após o procedimento de hiperimunização, respectivamente. Isto indica que a reação de conjugação resultou em um produto imunogênico, porém, sua qualidade precisará ser melhorada.

PALAVRAS-CHAVE: *P. aeruginosa*, conjugação, lipopolissacarídeo, albumina, imunógeno.

ABSTRACT

OBTAINMENT AND CHARACTERIZATION OF AN IMMUNOGENIC CONJUGATE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LIPOPOLYSACCHARIDE AND BOVINE SERUM ALBUMIN. *Pseudomonas aeruginosa* is an etiologic agent of opportunistic infections mainly in immunocompromised patients. Its inherent feature of developing resistance to a wide range of antibacterial agents make it a critical point in infection control. In animals, problems with multidrug resistance occur in otitis, cystitis, uveo-conjunctivitis, endometritis and mastitis, and there is no commercially available vaccine. With the aim of improving its immunogenicity, the lipopolysaccharide (LPS) antigen was coupled to bovine serum albumin (BSA) with *m*-periodate as the reductive agent. The conjugation was evaluated by gel-permeation chromatography, by quantitating total sugar and protein, and both LPS and BSA were detected in similar proportions. The immunization of mice with LPS-BSA conjugate vaccine resulted in an agglutinating antibody response against *P. aeruginosa* lower than that obtained for a mixture of free LPS and BSA. They were 65% and 86% lower in the 6th and 10th weeks after the hyperimmunization procedure, respectively. This indicates that the conjugation reaction resulted in an immunogenic product, however its quality should be improved.

KEY WORDS: *P. aeruginosa*, conjugation, lipopolysaccharide, albumin, immunogen.

INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo, não-fermentador, aeróbio estrito e é agente etiológico de infecções oportunistas em animais. É frequentemente isolada em casos de otite externa

e de cistite em cães, de úveo-conjuntivite e de endometrite em equinos e de mastite em ruminantes (RIBEIRO *et al.*, 2004; CLARK *et al.*, 2008; RUBIN *et al.*, 2008). Esta bactéria teve emergência com os adventos da antibioticoterapia na década de 50 para bactérias Gram-positivas. Características intrínsecas

²Secretaria de Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná, Departamento de Fiscalização e de Defesa Agropecuária, Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti”, Curitiba, PR, Brasil.

³Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, Curitiba, PR, Brasil.

de desenvolver multirresistência aos antibióticos, a capacidade de produzir biofilmes que favorecem infecções crônicas, bem como a expressão de fatores de virulência controlada pelo *quorum sensing*, a mantém como um ponto crítico no que se refere às dificuldades terapêuticas tanto em animais como no homem. Isto a torna fator agravante, principalmente em pacientes hospitalizados (BOYEN *et al.*, 2009; HØIBY *et al.*, 2010). Estes fatores justificam a necessidade de desenvolvimento de vacinas contra a *P. aeruginosa*, ainda não comercialmente disponíveis (DÖRING; PIER, 2008).

O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente pró-inflamatório da membrana celular das bactérias Gram-negativas, constituindo um alvo antigênico importante para a resposta imune (PIER, 2007). Porém, as vacinas produzidas a partir de células inteiras inativadas (bacterinas) ou compostas apenas pelo LPS da célula bacteriana (vacina de subunidade) conferem apenas resposta protetora temporária (KLOUWENBERG; BONT, 2008). Esse antígeno induz a produção de anticorpos por linfócitos B em uma via independente de linfócitos T-auxiliares, sem a geração de linfócitos de memória (JEURISSEN *et al.*, 2004).

No entanto, a memória imunológica aos antígenos T-independentes pode ser induzida pela estratégia conhecida como reconhecimento ligado, quando esses antígenos polissacarídicos são transformados em T-dependentes pela sua conjugação com uma proteína (LAMBERT *et al.*, 2005). No reconhecimento ligado de uma vacina conjugada, a célula B reconhece e liga ao carboidrato, internaliza e degrada todo o conjugado e então exhibe os peptídeos, derivados da proteína conjugada, acoplados às proteínas do Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe II (MHC II), na superfície da célula. As células T auxiliares, geradas em resposta à vacinação anterior ou por contato com o antígeno protéico, reconhecem o complexo na superfície da célula B e ativam as células B para produção de anticorpos, tanto para o carboidrato quanto para a proteína (JEURISSEN *et al.*, 2004).

Embora na área veterinária ainda não existam vacinas obtidas por meio de conjugação entre antígenos polissacarídicos bacterianos e proteínas, na área humana há exemplos de sucesso como a vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), que é composta pelo seu polissacarídeo capsular conjugado com toxoide tetânico (toxina tetânica inativada); vacinas contra *Neisseria meningitidis* Grupo C e contra sete sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* já foram licenciadas e muitas outras estão em desenvolvimento (KLOUWENBERG; BONT, 2008).

Conjugando-se o antígeno LPS de *P. aeruginosa* com a proteína albumina bovina (BSA), altera-se a via de seu reconhecimento pelo sistema imune,

gerando uma resposta T-dependente com células de memória para o antígeno LPS. Este trabalho testou uma técnica de conjugação do LPS de *P. aeruginosa* com BSA por aaminação redutiva direta utilizando *m*-periodato de sódio como agente redutor e avaliou sua imunogenicidade *in vivo* utilizando camundongos como modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de LPS

O lipopolissacarídeo (LPS) foi purificado da linhagem de *P. aeruginosa* ATCC 27853, de acordo com WESTPHAL; JANN (1965). Brevemente, a linhagem foi cultivada em ágar sangue a 37° C por 24h. A cultura foi suspensa em solução de NaCl 0,85% para inativação com formol 0,4% e as células bacterianas removidas por centrifugação por 20 minutos a 2.794 g a 8° C. A suspensão bacteriana (20 g em 350 mL de água destilada a 65° C) foi misturada com solução de fenol a 90% (350 mL, 65° C), sob agitação, por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se a suspensão a 2630g, em temperatura de 10° C, durante 40 minutos. Coletou-se o sobrenadante, tratando novamente as frações restantes com água destilada a 65° C, repetindo o processo mais duas vezes. Após extração, o sobrenadante coletado foi dialisado contra água destilada, utilizando-se membranas de celulose de massa de corte média de 13 kDa, à temperatura ambiente, realizando-se 4 trocas diárias por 4 dias. A concentração das amostras foi realizada em rotaevaporador, à temperatura de ~60° C, e depois armazenadas em freezer a -20° C.

Síntese do conjugado LPS-BSA

O método de conjugação empregado para a síntese do conjugado LPS-BSA foi adaptado de SHEN *et al.* (2001), utilizando-se o *m*-periodato de sódio como agente para a aaminação redutiva direta. Dissolveram-se 90 mg de LPS em 9 mL de água destilada, adicionando-se *m*-periodato de sódio (NaIO₄) 4 mM, sob agitação, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 1,5h. Em seguida, adicionou-se etilenoglicol, agitando-se por mais 30 minutos. O material foi então dialisado contra água destilada por 3 dias, utilizando-se membranas de celulose de massa de corte média de 13 kDa, à temperatura ambiente, realizando-se 4 trocas diárias. Após diálise, foi adicionado bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 0,1 M e o pH ajustado para 8,5; em seguida solubilizaram-se 60,3 mg de BSA e finalmente adicionou-se cianoborohidreto de sódio (NaCNBH₄) 20 mg/mL sob agitação, ao abrigo da luz, a 37° C, por 5 dias. Após o tempo de incubação, a reação de conjugação foi

estacionada com borohidreto de sódio (NaBH_4) 10 mg/mL. Em seguida a solução foi dialisada contra água destilada por 4 dias, utilizando a metodologia descrita acima. A concentração das amostras foi realizada em rotaevaporador, à temperatura de $\sim 60^\circ\text{C}$, e depois armazenadas em freezer a -20°C .

Análises do LPS, BSA e do imunoconjugado LPS-BSA

As dosagens de açúcar (AT) e de proteína (PT) totais foram realizadas pelo método de DUBOIS *et al.* (1956) e pelo método de HARTREE (1972), respectivamente. Para a avaliação da reação de conjugação, as amostras de LPS, BSA e de imunoconjugado LPS-BSA foram aplicadas separadamente em coluna de gel-permeação de Sepharose CL-4B (Sigma®), de 60,3 cm de altura com 2 cm de diâmetro, eluídas com solução salina (NaCl 0,85%) e alíquotas de 2 mL foram coletadas para dosagens de AT e PT, construindo-se os perfis de eluição.

Imunização dos camundongos

Camundongos fêmeas Swiss de 8 semanas foram obtidos do biotério da Universidade Federal do Paraná, e o protocolo descrito a seguir foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEEA/UFPR, sob nº de processo 23075030887/2007-77. Os animais foram tratados com ração própria para camundongos e água filtrada *ad libitum*. A hiperimunização dos animais foi realizada pela via subcutânea segundo LABORDE; DE FAJARDO (1969). Os animais foram inoculados 3 vezes por semana por 3 semanas e na quarta semana diariamente, recebendo um total de 16 aplicações. O sangue foi colhido pela via periorbital 15 dias após a última dose da vacina e depois mensalmente. Na 14ª semana depois de finalizada a hiperimunização, uma nova dose foi administrada a todos os grupos para observar um possível efeito de reforço, titulando-se os soros novamente 2 semanas depois.

Foram delineados os seguintes grupos, contendo 5 camundongos cada: Grupo 1 - controle 1 (solução NaCl 0,85%); Grupo 2 - controle 2 (vacina contendo 20 μg /dose de LPS adicionada de BSA 24 μg /dose); Grupo 3 - vacina contendo imunoconjugado LPS-BSA com 20 μg de LPS/dose e 24 μg de BSA/dose. Todas as vacinas foram adicionadas de adjuvante gel de hidróxido de alumínio (Omega®) 3%.

Avaliação da resposta imune *in vivo*

O título de anticorpos aglutinantes foi estimado por soroaglutinação em lâmina como descrito previamente por LABORDE; DE FAJARDO (1969). Foram realizadas diluições seriadas do soro (fator de diluição

de 2x) para a determinação do título aglutinante, que é definido como sendo a maior diluição da amostra onde ocorre reação positiva. Para a análise estatística, foi aplicado o teste *t* de Student, com $\alpha = 0,05$ para comparação das médias dos títulos aglutinantes entre os grupos vacinados e grupo controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento de extração do lipopolissacarídeo (LPS) de *P. aeruginosa* utilizado para a reação de conjugação com albumina bovina (BSA) foi de 1,5%, valor semelhante ao obtido por AL-ZEER *et al.* (2007), entre 2-4%; a dosagem de açúcar total do extrato foi de 517,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, não se detectando proteínas. Neste trabalho, utilizou-se o LPS para a síntese do conjugado por ser o componente mais imunogênico de bactérias Gram-negativas, apesar de ser pirogênico dependendo da dose (HOLDER, 2004), e, de fato, este efeito colateral foi observado nos animais testados após a primeira e segunda doses administradas.

Não foram realizados ensaios para quantificar o potencial pirogênico de LPS ou LPS-BSA, mas sendo o LPS o principal componente pró-inflamatório da membrana externa de bactérias Gram negativas, estudos posteriores para atenuar a pirogenicidade serão necessários. Em estudos clínicos onde vacinas contra *P. aeruginosa* baseadas em LPS foram administradas a pacientes com fibrose cística, houve 20-40% de reação adversa febril (DÖRING; PIER, 2008). Como a principal porção pirogênica do LPS é atribuída à sua porção lipídica, um processo de despirogenização com a utilização de álcalis, em condições controladas, para a remoção do Lipídio A e manutenção do Antígeno-O poderia ser realizado (SEID; SADOFFI, 1981).

Para a caracterização do imunoconjugado LPS-BSA, foram feitas dosagens de açúcar e proteína totais, obtendo-se, respectivamente, as concentrações de 373 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\sim 45\%$ de LPS) e de 463 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\sim 55\%$ de BSA), e recuperação de $\sim 40\%$ de LPS após a reação de conjugação. As proporções entre açúcar e proteína de diferentes tipos de imunoconjugados de *P. aeruginosa* variam de acordo com os antígenos utilizados e as técnicas de conjugação. Isto já foi relatado para o conjugado de LPS (87,5%) e 1,4-diaminobutil BSA (12,5%) (TSAY; COLLINS, 1984) utilizando a técnica de aminação redutiva com *m*-periodato de sódio, e, para o conjugado octavalente de LPS livre de Lipídeo A (37%) e Toxina A (63%) (CRYZ *et al.*, 1989) utilizando *m*-periodato de sódio como redutor e o ácido adípico dihidrazida como espaçador.

A análise de gel-permeação (Fig. 1) mostrou um perfil de eluição do LPS extraído com um pico definido na fração de 4 mL com uma cauda arrastada até a alíquota coletada correspondente ao tubo de 48 mL, provavelmente devido aos diferentes tamanhos

que o LPS pode apresentar, dependendo do número de resíduos de açúcar no polissacarídeo O (Ag O). Já foram descritas massas moleculares para as porções polissacarídicas do LPS de *P. aeruginosa* entre 3×10^4 e $2,25 \times 10^5$ g/mol (PIER *et al.*, 1981); como esse pico de detecção de açúcar ocorreu em um volume baixo (relacionado à eluição de componentes de maior massa molecular), e, considerando-se que os limites de exclusão do gel utilizado são de $3 \times 10^4 - 5 \times 10^6$ g/mol para dextranas e de $6 \times 10^4 - 2 \times 10^8$ g/mol para proteínas globulares, é possível que o LPS extraído esteja na forma de agregados moleculares.

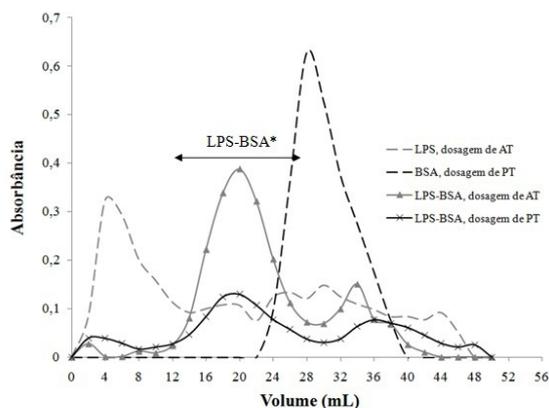


Fig. 1 - Perfis de eluição de açúcar total (AT, $\lambda = 490$ nm) e de proteína total (PT, $\lambda = 650$ nm) do lipopolissacarídeo (LPS) de *P. aeruginosa*, da albumina bovina (BSA) e do imunocombinado LPS-BSA em coluna de Sepharose CL-4B (altura 60,3 cm x diâmetro 2,0 cm). *A seta indica a faixa de volume de eluição que provavelmente contém LPS e BSA ligados covalentemente.

O perfil de eluição da BSA (M_w : $6,6 \times 10^4$ g/mol) utilizada para a conjugação mostrou um pico definido entre os volumes de 20 e 40 mL, indicando ausência de polidispersão de massas moleculares. Por meio da comparação dos perfis de eluição do LPS extraído, da BSA e do conjugado LPS-BSA, verificou-se que o último apresentou um primeiro pico, pequeno, em torno de 2 mL que provavelmente representa a fração de LPS agregada que não foi conjugada durante a reação ou, ainda, uma fração de maior massa molecular do conjugado LPS-BSA, pois também houve detecção de albumina em torno desse volume de eluição. O maior pico observado no perfil de eluição de LPS-BSA, tanto para dosagem de AT como de PT, foi detectado em torno de 20 mL, indicando conter a fração de LPS conjugada quimicamente a BSA, pois há total sobreposição das dosagens de AT e de PT.

De acordo com os resultados descritos na Figura 2, todos os grupos, exceto o grupo 1 (controle inoculado com NaCl 0,85%), apresentaram título de anticorpos detectável na soroaglutinação. O grupo 2 (vacina

contendo 20 mg/dose de LPS adicionada de BSA 24 mg/dose) obteve maiores títulos em comparação com o grupo 3 (vacina contendo imunocombinado LPS-BSA com 20 mg de LPS/dose e 24 mg de BSA/dose), indicando que o antígeno conjugado apresentou menor potencial imunogênico que o LPS não conjugado.

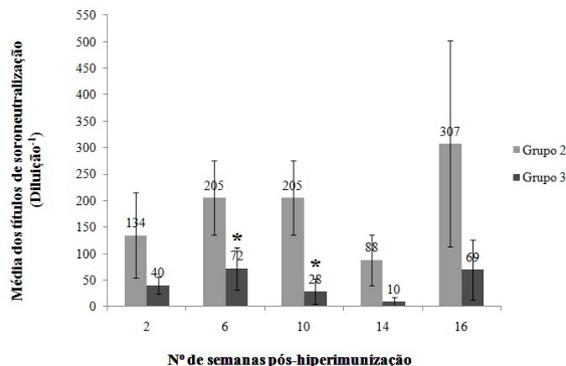


Fig. 2 - Comparação entre os títulos médios de anticorpos dos camundongos hiperimunizados do grupo 2 (mistura LPS 20 μ g/dose e BSA 24 μ g/dose) e grupo 3 (imunocombinado LPS 20 μ g/dose e BSA 24 μ g/dose ligados covalentemente), obtidos por meio de soroaglutinação em lâmina, sendo a leitura da 16ª semana realizada após aplicação de dose de reforço vacinal. *Diferença estatisticamente significativa, $\alpha = 0,05$.

Particularmente, houve diferença estatisticamente significativa entre os títulos dos grupos 2 e 3 na 6ª e na 10ª semanas após a hiperimunização, sendo os títulos médios do grupo inoculado com o imunocombinado LPS-BSA, respectivamente 65% e 86% menores que os obtidos para os animais inoculados com uma mistura LPS e BSA não conjugados covalentemente. É possível que a reação de conjugação tenha provocado a hidrólise de parte do LPS utilizado, o que resultaria em uma menor concentração de LPS imunogênico administrado ao grupo 3. Além disso, a detecção de BSA pós-conjugação, acima de 40 mL, em um volume de eluição mais alto que o da BSA pré-conjugação, também é um indicativo de degradação proteica.

A aplicação de uma nova dose na 14ª semana do protocolo de hiperimunização, quando houve queda acentuada do título de anticorpos em todos os grupos, foi realizada com o objetivo de observar maior aumento do título no grupo 3, onde poderia ter sido estabelecida a memória imunológica contra o antígeno LPS de *P. aeruginosa*. Porém, avaliando-se os títulos dos soros colhidos na 16ª semana (Fig. 2), verificou-se que ambos os grupos responderam à dose de reforço, o que indica que para uma melhor avaliação seria necessário aguardar até que os grupos se tornassem negativos para a reação de soroaglutinação antes da aplicação da

dose de reforço. Assim como estudos posteriores envolvendo, por exemplo, o isolamento de linfócitos B de animais imunizados e não-imunizados, com a comparação da resposta ao antígeno *in vitro* seriam necessários para a confirmação da memória imunológica.

O esquema de imunização consistindo de 16 aplicações foi utilizado pois a avaliação da imunogenicidade de LPS e de LPS-BSA por meio de desafio vacinal com dose letal de 100%, após 4 doses, resultou em morte de todos os animais (dados não apresentados). Isto indicou que o método do desafio vacinal não permitiria verificar diferenças sutis na indução de anticorpos anti-*Pseudomonas*. Porém, este esquema de hiperimunização pode ter prejudicado os títulos de anticorpos aglutinantes detectados, pois, posteriormente, verificou-se que a aplicação de 4 doses de 20 µg de LPS de *P. aeruginosa* (n = 5), induziu um título médio de aglutinação de ~1:800 (dados não apresentados), superior ao obtido neste trabalho.

A IATS (International Antigenic Typing Scheme) define hoje 20 sorogrupos, de acordo com as diferentes estruturas químicas encontradas no Ag-O de isolados clínicos de *P. aeruginosa* (BYSTROVA *et al.*, 2006). Neste estudo, apenas uma linhagem de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) foi utilizada para a obtenção do imunógeno, mas o ideal é que as vacinas a serem desenvolvidas contra esse micro-organismo sejam multivalentes, composta pelos sorotipos prevalentes em cada região para tentar contornar essa questão da variabilidade antigênica para uma resposta imune eficiente.

Com relação aos estudos de imunogenicidade de diferentes conjugados de polissacarídeos de *P. aeruginosa* e proteínas, foram observadas boas respostas imunes protetoras, como a vacina octavalente de Ag-O purificado conjugada com exotoxina A (CRYZ *et al.*, 1989) que, após administração intramuscular em camundongos, garantiu proteção contra o desafio com os sorotipos utilizados como antígenos. Sua administração intranasal, utilizando como adjuvantes a toxina de *Vibrio cholerae* ou oligonucleotídeos contendo motivos CpG em camundongos, também resultou em proteção efetiva (ZUERCHER *et al.*, 2005). Outro imunocombinado que já foi estudado é o do alginato conjugado com toxoide tetânico, utilizando ácido adípico como espaçador e EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) para conjugação, e resultados em camundongos mostraram proteção contra doses letais de *Pseudomonas* sp. do morfotipo mucoide que secretam alginato (KASHEF *et al.*, 2006). O alginato é uma estrutura bem menos variável do que o LPS, apenas varia no seu tamanho molecular, dependendo do número de resíduos ligados ao polímero, mas isso também pode interferir na resposta imune.

CONCLUSÕES

A hiperimunização dos camundongos com o conjugado de lipopolissacarídeo de *P. aeruginosa* e albumina bovina resultou em resposta de produção de anticorpos aglutinantes, indicando que a imunogenicidade do LPS foi mantida, em parte, após a reação de conjugação. Os resultados obtidos nos testes de imunização indicam que é preciso melhorar a qualidade do conjugado obtido, pois, embora a análise de gel-permeação tenha indicado a ligação covalente entre LPS-BSA, o título de anticorpos do grupo inoculado com o conjugado foi inferior ao do grupo inoculado com LPS sem conjugar. Investigações futuras quanto às reações adversas desse imunógeno e sua habilidade para estabelecer resposta imune protetora em longo prazo, com geração de memória imunológica contra a infecção por *P. aeruginosa*, são necessárias.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Ministério da Educação - Brasil) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AL-ZEER, M.; MASOUD, H. LPS-based conjugate vaccines composed of O-polysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* IATS 6 and 11 bound to a carrier protein. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.23, p.1541-1549, 2007.
- BOYEN, F.; EECKHAUT, V.; VAN IMMERSEEL, F.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary Microbiology*, v.35, p.187-195, 2009.
- BYSTROVA, O.V.; KNIREL, Y.A.; KOCHAROVA, N.A.; KATZENELLENBOGEN, E.; GAMIAN, A. Structures of the core oligosaccharide and O-units in the R- and SR-type lipopolysaccharides of reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* O-serogroups. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.46, p.85-99, 2006.
- CLARK, C.; GREENWOOD, S.; BOISON, J.O.; CHIRINOTREJO, M.; DOWLING, P.M. Bacterial isolates from equine infections in western Canada (1998-2003). *Canadian Veterinary Journal*, v.49, p.153-160, 2008.
- CRYZ, JUNIOR S.J.; SADOFF, J.C.; CROSS, A.S.; FURER, E. Safety and immunogenicity of a polyvalent *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 50 polysaccharide-toxin A conjugate vaccine effect of a booster dose on antibody levels in humans. *Infection and Immunity*, v.56, p.1829-1830, 1989.

- DÖRING, G.; PIER, G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, v.26, p.1011-1024, 2008.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v.48, p.422-427, 1972.
- HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.35, p.322-332, 2010.
- HOLDER, I.A. *Pseudomonas* immunotherapy: a historical overview. *Vaccine*, v.22, p.831-839, 2004.
- JEURISSEN, A.; CEUPPENS, J.L.; BOSSUYT, X. T lymphocyte dependence of the antibody response to T lymphocyte independent type 2' antigens. *Immunology*, v.111, p.1-7, 2004.
- KASHEF, N.; BENZADIAN-NEJAD, Q.; NAJAR-PEERAYEH, S.; MOUISAVI-HOSSEINI, K.; MOAZZENI, M.; DJAVID, G.E. Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-tetanus toxoid conjugate. *Journal of Medical Microbiology*, v.55, p.1441-1446, 2006.
- KLOUWENBERG, P.K.; BONT, L. Neonatal and Infantile Immune Responses to Encapsulated Bacteria and Conjugate Vaccines. *Clinical and Developmental Immunology*, v.2008, 10p., ID 628963, doi:10.1155/2008/628963 2008. Disponível em: <<http://downloads.hindawi.com/journals/cdi/2008/628963.pdf>>. Acesso em: 1 out. 2010.
- LABORDE, H.F.; DE FAJARDO, C.L. Obtention and assay of rabbit anti-*Pseudomonas* serum. *Journal of Bacteriology*, v.98, n.3, p.992-995, 1969.
- LAMBERT, P.-H.; LIU, M.; SIEGRIST, C.-A. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nature Medicine*, v.11, n.4, p.S54-S62, 2005.
- PIER, G.B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *International Journal of Medical Microbiology*, v.297, n.7/8, p.641-660, 2007.
- PIER, G.B.; SIDBERRY, H.F. E SADOFF, J.C. High-Molecular-Weight Polysaccharide Antigen from *Pseudomonas aeruginosa* Immunotype 2. *Infection and Immunity*, v.34, n.2, p.461-468, 1981.
- RIBEIRO, M.G.; SIQUEIRA, A.K.; LANGONI, H.; PAES, A.C.; VICTÓRIA, C.; DA SILVA A.V.; LISTONI, F.J.P.; SOUZA, A.H. Modified E-test by the addition of EDTA-Tris and dimethyl sulfoxide on the potentiation of the effects of some antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from bovine mastitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.5, p.676-678, 2004.
- RUBIN, J.; WALKER, R.D.; BLICKENSTAFF, K.; BODEIS-JONES, S.; ZHAO, S. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Veterinary Microbiology*, v.13, p.164-172, 2008.
- SEID, R.C.; SADOFFI, J.C. Preparation and characterization of detoxified lipopolysaccharide-protein conjugates. *The Journal of Biological Chemistry*, v.256, n.14, p.7305-7310, 1981.
- SHEN, X.; LAGERGARD, T.; YANG, Y.; LINDBLAD, M.; FREDRIKSSON, M.; HOLMGREN, J. Preparation and preclinical evaluation of experimental group B streptococcus type III polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccine for intranasal immunization. *Vaccine*, v.19, p.850-861, 2001.
- TSAY, G.C.; COLLINS, M.S. Preparation and characterization of a nontoxic polysaccharide-protein conjugate that induces active immunity and passively protective antibody against *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 1 in mice. *Infection and Immunity*, v.45, n.1, p.217-221, 1984.
- WESTPHAL, O.; JANN, K. Bacterial Lipopolysaccharides - Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v.5, p.83-91, 1965.
- ZUERCHER, A.W.; IMBODEN, M.A.; JAMPEN, S.; BOSSE, D.; ULRICH, M.; CHTIQUI, H.; LAUTERBURG, B.H.; LANG, A.B. Cellular immunity in healthy volunteers treated with an octavalent conjugate *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. *Clinical and Experimental Immunology*, v.143, p.132-138, 2005.

Recebido em 11/11/10

Aceito em 28/10/11