

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Produção e purificação de anticorpos específicos contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina produzidos em eqüinos imunizados com uma vacina de DNA

Diego Viali dos Santos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Porto Alegre, junho de 2006

Inicialmente este projeto foi desenvolvido no Laboratório do Grupo de Microbiologia Molecular e Funcional, Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As etapas finais foram executadas no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Além destes, os eqüinos utilizados no projeto foram mantidos no Laboratório de Reprodução Animal, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este trabalho foi financiado com recursos da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Dedico este trabalho aos meus pais, Juessi e Marlene,
e a minha amada Carolina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^ª. Dr^ª. Denise Cantarelli Machado, pela orientação, amizade e sinceridade durante estes últimos cinco anos de trabalho em conjunto. Prestigio imensamente os laços de amizade construídos durante nosso convívio.

Aos amigos e colegas de laboratório Rodrigo Ducati, Rafael Silva, Isabel Fonseca, Clarissa Czekster, Juliano Murad e Isabel Werlang pelo trabalho, ajuda e amizade.

Ao Procópio Senna, Daniela Roth, Jaim Oliveira, Christopher Schneider, Fernanda Ely, André Gastaldo e demais colegas pela amizade formada, irrestrita ao ambiente de trabalho.

Ao Elmo Cardoso e Ellen Oliveira, pelo exemplar profissionalismo, eficiência e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, pela oportunidade da realização desta etapa.

À FINEP, pelo financiamento deste projeto.

Aos meus irmãos, Juliano e Rodrigo, pela ajuda e incentivo durante todo o mestrado.

À Zilca Gyenes, por ter me recebido como um filho em sua casa, me oportunizando a redação deste trabalho em um ambiente tranquilo e fraterno.

Aos meus demais amigos e familiares, pelo imensurável apoio e incentivo durante todo este período.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO	8
<i>ABSTRACT</i>	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Antimicrobianos	10
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.....	13
1.3. Vacinas de DNA.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. MANUSCRITO.....	20
4. DISCUSSÃO.....	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.: antes de Cristo

Da: Dalton

DNA: ácido desoxirribonucléico

FDA: *Food and Drug Administration* (Agência Norte-americana reguladora de medicamentos e alimentos)

IPTG: *isopropyl β-D-thiogalactopyranoside* (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo)

kb: Quilo-base

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)

pb: pares de bases

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PLP2a: proteína ligadora de penicilina 2a

RNA: ácido ribonucléico

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

SDS: *sodium dodecyl sulphate* (dodecilsulfato de sódio)

RESUMO

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (SARM) é um dos principais patógenos responsáveis pela infecção nosocomial e recentemente tem sido isolada fora do ambiente hospitalar, trazendo uma grande preocupação a médicos e pesquisadores. Esta resistência à meticilina é devida à presença do gene *mecA*, o qual codifica a PLP2a, uma proteína ligadora de penicilina, que tem baixa afinidade pelos antibióticos β -Lactâmicos. A vancomicina, até recentemente, era o tratamento de escolha para pacientes acometidos pela SARM; porém o isolamento de cepas com resistência intermediária e *S. aureus* totalmente resistentes à vancomicina, gerou uma grande mobilização da comunidade científica na busca de alternativas para o tratamento destas cepas multirresistentes, através do desenvolvimento de vacinas e soroterapia. A vacina de DNA é uma técnica recente que, entre outras vantagens, não necessita da purificação do antígeno protéico para induzir uma resposta imune, diminuindo o custo de produção, quando comparada às vacinas protéicas. Neste trabalho, demonstramos que a utilização de uma vacina de DNA com um fragmento do gene *mecA* produz uma resposta imune humoral, com a produção de anticorpos específicos anti-PLP2a em eqüinos imunizados com esta vacina, e que estes anticorpos, após sua purificação, permanecem ativos. Como ainda não existe informação suficiente em relação à segurança do uso das vacinas de DNA diretamente em humanos, o uso desta técnica em eqüinos, com o objetivo de gerar um soro hiperimune, para utilizá-lo após sua purificação no tratamento de pacientes acometidos com infecção provocada por SARM, poderia ser uma alternativa viável e segura no combate a esta bactéria resistente a quase todos agentes antimicrobianos.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the major pathogens responsible for nosocomial infection and has been recently isolated outside the hospital environment, causing a great concern to physicians and researchers. This methicillin-resistance is due to the presence of the *mecA* gene, which codes for PBP2a, a penicillin-binding protein, which has low affinity for β -Lactamic antibiotics. The treatment of choice for patients afflicted by MRSA was, until recently, vancomycin; however the isolation of vancomycin-intermediate and resistant *S. aureus* strains generated a great mobilization of the scientific community for the search of alternatives for the treatment of these multi-resistant strains, such as, for example vaccines and sorotherapy. The DNA vaccine is a recent method that, among others, does not require the purification of the of the proteic antigen to induce a immune response, reducing production costs as compared to protein vaccines. In the present study we demonstrated that the use of a DNA vaccine with a fragment of the *mecA* gene produces an humoral immune response, with the production of anti-PBP2a specific antibodies in horses immunized with this vaccine, and these antibodies, once purified, maintain their activity. Since there is not sufficient information about the safety of DNA vaccines used directly to humans, the use of this vaccine in horses, with the intent of generating an hyperimmune serum to be used after its purification in the treatment of patients afflicted with infection caused by MRSA could be a possible and safe alternative to fight this bacteria resistant to almost all antimicrobial agents.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antimicrobianos

Desde a antigüidade, o homem vem utilizando substâncias para o tratamento de infecções e enfermidades. Na China e no Egito, no ano 2500 a.C., há relatos do uso de macerado de soja e *myrrha* (resina extraída do tronco de árvores e arbustos do gênero *Commiphora*) para o tratamento de feridas e infecções cutâneas. Por volta do ano 2000 a.C., há indícios do uso do mel e gordura animal para o tratamento de feridas infectadas, e ainda, no ano 400 a.C, na Grécia, Hipócrates descreveu as propriedades terapêuticas da *myrrha*. Esta mesma substância era utilizada amplamente em Roma para o tratamento de vários processos infecciosos cutâneos (revisado em ACUNA, 2003).

Joseph Lister, em 1865, demonstrou que utilizando fenol líquido era possível desinfetar materiais cirúrgicos, feridas e incisões, e que isto diminuía a incidência de infecções nos pacientes internados em hospitais. Logo após, em 1889, Rudolf Emmerich e Oscar Loew descreveram a *piocianasa* (substância produzida por certas bactérias), que era capaz de inibir e matar patógenos como os agentes causadores da difteria, febre tifóide, antraz e abscessos de pele, sendo usada durante 30 anos, apesar de sua grande toxicidade (revisado em ACUNA, 2003).

A chamada Era Antimicrobiana tem seu marco inicial no ano de 1928, quando Alexander Fleming descobre a penicilina através da inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* em placa contaminada com *Penicillium notatum*. Tal relato, publicado em 1929, não atraiu a atenção do mundo científico e médico. Ainda em 1928,

Gerhard Domagk demonstrou que a sulfa curava infecções sistêmicas estreptocócicas e esta descoberta lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1939. Em 1940, Howard Walter Florey e Ernst Boris Chain estudaram melhor as características químicas da penicilina e a utilizaram como droga sistêmica para o tratamento de infecções. Este estudo também rendeu o Prêmio Nobel de Medicina aos três pesquisadores (Florey, Chain e Fleming) em 1945 (revisado em SANTOS, 1996). Nas três décadas seguintes, várias novas classes de antimicrobianos foram lançadas no mercado farmacêutico (Tabela 1).

Tabela 1. Cronologia da descoberta de novos antibióticos da Era Antimicrobiana (Adaptado de POWERS, 2004).

Ano de Introdução	Classe da Droga
1935	Sulfonamidas
1941	β -Lactâmicos (Penicilina)
1944	Aminoglicosídeos
1949	Cloranfenicol
1950	Tetraciclina
1952	Macrolídeos/Lincosamidas/Espreptograminas
1956	Glicopeptídeos
1957	Rifamicinas
1959	Nítromidazoles
1962	Quinolonas
1968	Trimetropin
2000	Oxazolidinonas
2003	Lipopeptídeos

A partir da década de 1970, nenhuma nova classe de antimicrobiano foi lançada no mercado farmacêutico até o ano 2000, como foi visto na Tabela 1. Além disso, o uso indiscriminado dos antibióticos por médicos, veterinários e outros profissionais da saúde, fez com que surgissem cepas de microorganismos resistentes a estas novas classes de antimicrobianos logo após o descobrimento destas substâncias, como é demonstrado na Tabela 2. Concomitantemente, cepas de microorganismos multirresistentes foram isoladas em diversas partes do mundo. Muitos microorganismos até então tidos como controlados, reemergiram como o *Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus*, entre outros (HIRAMATSU et al., 1997; RUFFINO-NETO, 2002).

No final da década passada, a OMS divulgou nota afirmando que o risco de uma nova Era Pré-antimicrobiana é iminente, já que o uso indiscriminado dos antibióticos levou a um quadro de multirresistência por parte de muitos microorganismos (WHO, 2000). A busca por alternativas para o tratamento de pessoas e animais acometidos por estas bactérias multirresistentes, além da utilização dos medicamentos existentes com maior parcimônia, foram algumas das soluções apontadas pela OMS para estancar este processo de resistência dos microorganismos perante os antimicrobianos existentes.

Tabela 2. Ano do relato e mecanismo de resistência a diversas drogas na Era Antimicrobiana (Adaptado de POWERS, 2004).

Droga Antimicrobiana	Aprovação pelo FDA (Ano)	Relato da Resistência (Ano)	Mecanismo da Resistência
Penicilina G	1943	1940	Produção de Penicilase
Streptomicina	1947	1947	Mutação da Proteína Ribossomal S12
Tetraciclina	1952	1952	Efflux
Penicilina e Tetraciclina	1943 e 1952	1976-80	Plasmídeo que codifica β -Lactamases e Efflux
Meticilina	1960	1961	Gene <i>mecA</i> (Codifica a Proteína Ligadora de Penicilina 2a – PLP2a-).
Ácido Nalidíxico	1964	1966	Mutações na Topoisomerase
Gentamicina	1967	1969	Modificação da Enzima Aminoglicosidase.
Cefotaxima	1981	1981	AmpC β -Lactamase
Linezolida	2000	1999	Mutação no RNA 23S

1.2. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

A *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) é o principal patógeno encontrado nas infecções nosocomiais adquiridas e, portanto, o maior responsável pelas altas taxas de morbidade e mortalidade nos hospitais do mundo inteiro. A resistência das cepas de *S. aureus* a drogas de primeira linha, tais como penicilinas sintéticas, tem

originado sérios problemas para o tratamento das infecções causadas por estes patógenos, cuja incidência vem crescendo assustadoramente (WHO, 2000).

Em 1961, as primeiras cepas de SARM fizeram uma discreta aparição em um hospital da Inglaterra (JEVONS, 1961). Os casos de infecções por SARM se seguiram na Inglaterra e em outros países europeus, espalhando-se rapidamente e causando sérias epidemias em hospitais em muitos países (GOLDSTEIN & ACAR, 1996).

A resistência aos β -Lactâmicos do grupo M (metecilina, oxacilina) está ligada à produção de uma proteína ligadora de penicilina (PLP) adicional, a PLP2a, de 76 kDa, codificada pelo gene *mecA* de 45 kb (CHAMBERS, 1997). Esta enzima apresenta como principal característica uma baixíssima afinidade de ligação por todos os β -Lactâmicos. Na prática, quando uma cepa de SARM entra em contato com um antibiótico β -Lactâmico, as PLPs normais são bloqueadas. Porém, a PLP2a consegue sozinha fazer todo o trabalho de transpeptidação (DE JONGE et al., 1993), permitindo a formação do peptidoglicano e a sobrevivência da bactéria.

Sendo assim, os glicopeptídeos, dentre eles a vancomicina, são as drogas antimicrobianas que restaram para o tratamento das infecções causadas por SARM. No final da década de 90, foram descritos isolados clínicos de SARM com susceptibilidade intermediária à vancomicina no Japão, nos Estados Unidos e no Brasil (HIRAMATSU et al., 1997; TENOVER et al., 1998; LUTZ et al., 1999). Estas cepas, chamadas VISA (*Vancomycin Intermediate S. aureus*), devido a múltiplas mutações no seu DNA, que resultam em um engrossamento da parede bacteriana, necessitam de uma maior quantidade de antibiótico para a inibição das suas enzimas responsáveis pela síntese da parede bacteriana (HIRAMATSU, 2001). A VISA necessita de uma maior quantidade de nutrientes e tem um crescimento mais lento quando comparada à SARM, e sendo assim, só

consegue manter-se no ambiente sob pressão seletiva através do uso de antibióticos que inibam o crescimento de cepas de SARM (HIRAMATSU, 2001).

Entretanto, cepas de *S. aureus* totalmente resistentes à vancomicina (VRSA) foram isoladas em dois hospitais nos Estados Unidos em 2002. Esta resistência deve-se à transferência dos genes que determinam resistência à vancomicina, presentes em cepas de *Enterococcus faecalis* (PEARSON, 2002). Este gene está integrado a um plasmídeo que é reprimido na falta de vancomicina. Esta cepa VRSA, como a VISA, também possui um crescimento mais lento, sendo isolada apenas quando em presença de vancomicina (CHANG, 2003).

Mesmo com a existência destas outras cepas, segundo HIRAMATSU et al. (2004), “A verdadeira essência do problema é a SARM”. Isto se deve à rápida disseminação de resistência entre as cepas SARM, que ocorre por transferência horizontal e vertical de material genético e pela crescente incidência de infecção hospitalar provocada por esta bactéria. Segundo o Sistema de Vigilância de Resistência Antimicrobiana Europeu (EARSS), a prevalência de SARM como agente responsável pelas infecções hospitalares em países como Itália, Inglaterra e Bélgica, alcança alarmantes 30%.

Outro ponto importante que contribui para a disseminação de SARM, é o fato de esta bactéria colonizar até indivíduos saudáveis que atuam como carreadores e transmissores desta cepa. A colonização pode ocorrer em várias áreas do corpo, mas inicialmente ocorre nas narinas, e qualquer rompimento da barreira natural existente pode determinar o livre acesso desta bactéria aos tecidos adjacentes e até mesmo à circulação sanguínea (WHO, 2000).

Além disso, a SARM também causa um considerável impacto econômico. Cada paciente acometido por infecção hospitalar, tendo como agente etiológico a SARM, tem

um custo e um tempo de hospitalização três vezes maior quando comparado aos pacientes acometidos com *S. aureus* suscetível à meticilina (ABRAMSON & SEXTON, 1999).

Recentemente, nos Estados Unidos, a SARM, que era encontrada apenas em ambientes hospitalares, provocou a morte de quatro crianças que não tiveram contato com o ambiente hospitalar (CDC, 1999). Esta SARM foi chamada de Comunidade-Adquirida. Apesar de ser diferente da cepa isolada em hospitais, não sendo multirresistente a outras classes de antibióticos (ROBERTS et al., 2006; TENOVER et al., 2006), esta SARM Comunidade-Adquirida foi isolada em diversas partes do mundo (DAILEU et al., 2005; HSU et al., 2006) e devido a sua rápida disseminação (DIEDEREN & KLUYTMANS, 2005), vem provocando medo entre médicos e pesquisadores pelo risco de causar uma grande epidemia (BARIE, 2005; CREECH et al., 2006).

Dito isto, e tendo em vista a acelerada aquisição de resistência por parte destes patógenos, vários estudos abrangendo novas alternativas para combatê-los estão sendo elaborados (DANI, 2000). Uma das várias alternativas para o tratamento destas doenças infecciosas, provocadas por patógenos resistentes a antimicrobianos, é a imunização passiva. A imunização passiva surgiu há mais de 100 anos (revisado CASADEVALL & SCHARFF, 1994), e com a introdução dos antimicrobianos em 1940, deixou de ser utilizada para muitas doenças, sendo empregada atualmente somente em certos casos, como para o tratamento de indivíduos envenenados por toxinas ofídicas (KARSLON-STIBER et al., 1997). A administração de anticorpos neutralizantes pode bloquear proteínas essenciais e exclusivas, expostas tanto em vírus como em bactérias, o que a torna uma estratégia eficaz quando utilizada em indivíduos imunodeprimidos, que não são capazes de responder imunologicamente à vacinação como indivíduos sadios (CHIPPAUX, 1998).

1.3 Vacinas de DNA

No início da década de 90, WOLFF et al. (1992) demonstraram que um gene poderia ser expresso *in vivo* por um longo período, após injeção de DNA plasmidial em células musculares de camundongos, e que a proteína expressa mantinha sua atividade biológica. A partir desta descoberta, pôde-se concluir que qualquer proteína heteróloga poderia ser expressa *in vivo*, estimulando assim uma resposta imune específica contra ela. Assim surgiram as vacinas de DNA, e inúmeros estudos desta nova tecnologia vem sendo realizados (GORDON & RAMSHAW, 2003).

Os plasmídeos bacterianos são os vetores de escolha para esta tecnologia, embora alguns estudos relatem a utilização de RNA. Os plasmídeos consistem de DNA dupla fita, circular e covalentemente fechado, o qual pode ser manipulado para a inserção de genes que codificam o imunógeno de interesse, estimulando assim, uma resposta imune específica contra a proteína expressa resultante. As vacinas de DNA contêm essencialmente duas unidades funcionais, o cassete de expressão para o gene inserido, que possui os elementos reguladores que controlam e permitem a transcrição deste em células eucarióticas; e as sequências imuno-estimulatórias (ISS), compostas de dinucleotídeos CpG não metilados presentes no DNA bacteriano e que são os elementos-chave destas vacinas (ZHU et al., 2001).

Entre as vantagens da vacina de DNA, pode-se citar: (1) – a segurança, com ausência de reações indesejáveis no local de administração e a inexistência do risco de causar doença, como quando se utilizam vacinas baseadas em organismos vivos atenuados;

(2) – estimulam ambos os tipos de resposta imune (celular e humoral); (3) – podem mimetizar alguns aspectos de uma infecção natural no hospedeiro; (4) – são termo-estáveis e de fácil produção e purificação; (5) – têm baixo custo de produção, o que possibilita seu emprego em países em desenvolvimento (BABIUK et al., 2000).

Além disso, o grande mérito da vacina de DNA é que ela pode gerar uma resposta imune contra uma proteína, sem a necessidade da purificação desta proteína (OHWADA et al., 1999).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O trabalho iniciado aqui, faz parte de um projeto que visa a busca de uma alternativa para o tratamento de pacientes acometidos por infecção hospitalar humana provocada por SARM.

2.2. Objetivos Específicos

A primeira etapa deste trabalho propõe a purificação de anticorpos específicos anti-PLP2a produzidos em equinos imunizados com uma vacina de DNA.

3. MANUSCRITO

A seguir, será apresentado o manuscrito referente ao trabalho desenvolvido durante o curso de Mestrado, que está em preparação e será submetido ao periódico científico *Vaccine*.

**Purification of Antibodies Produced in Horses Immunized with Anti-Methicillin
Resistant *Staphylococcus aureus* DNA Vaccine**

Diego V. Santos^{a,b}, José P. M. Senna^c, Isabel O. Fonseca^a, Luiz A. Basso^a, Denise C. Machado^a and Diógenes S. Santos^{a,*}

^a Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ipiranga Av, 6681/92A, Porto Alegre - RS, 90619-900, Brazil; ^b Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ^c Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - BioManguinhos, Brasil Av, 4365, Rio de Janeiro – RJ, 21040-900, Brazil.

* Corresponding author. Tel. and Fax: 55-51-33203629.
e-mail address: diogenes@pucrs.br

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is the major pathogen in nosocomial infections. This resistance is due to the presence of an additional penicillin-binding protein, PBP2a, encoded by the *mecA* gene. DNA vaccination of transgene-expressing plasmid has been demonstrated to elicit an immune response against transgene encoded-proteins. In this study, we purified and tested the activity of antibodies generated by horses immunized with a DNA vaccine containing an internal region of the PBP2a protein. Our results suggest that DNA immunization induces immune response by production of specific antibodies against PBP2a in horses. Once purified, the specific antibodies maintain the specific activity. This strategy could represent the basis for the development of immunological approaches (active and passive immunotherapy) to overcome MRSA infections.

Keywords: MRSA, DNA vaccine, PBP2a, horse-antibodies.

Abbreviated Article Title: Purification of Antibodies from Horses Immunized with DNA Vaccine.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is a major cause of life-threatening infections acquired in health care facilities and in the community. It causes illness through the secretion of numerous cell-surface virulence factors, which facilitate resistance to multiple antibiotics [1,2]. After penicillin's initial success in *S. aureus* infection treatment, penicillin-resistant *S. aureus* strains became a major threat in hospitals in the 1950s, forcing the use of methicillin and related drugs to ensure proper treatment. Unfortunately, the following decade revealed the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains [3]. By the 1980s, MRSA emerged and became endemic among hospitals, leading to an increased use of vancomycin [4,5]. As expected, vancomycin-intermediate and resistant *S. aureus* (VISA and VRSA) cases have been reported since then [6-11]. Vancomycin resistance has the potential to become a serious problem in MRSA strains, which are already resistant to multiple antimicrobial agents [12-16], leading to a worldwide worrisome among physicians, fearing a new and tragic era of untreatable MRSA infection.

Methicillin resistance is usually conferred by the chromosomal *mecA* gene, which encodes an altered penicillin-binding protein (PBP) called PBP2' or PBP2a [17]. PBPs are transpeptidases which catalyze the formation of cross-bridges in bacterial peptidoglycan. MRSA produces PBP2a as a fifth PBP in addition to the four already found in all *S. aureus* strains. The expression of PBP2a makes MRSA cells resistant to β -lactam antibiotics, as this drug-group cannot inhibit the function of the additional PBP owing to their low binding affinities for PBP2a [18].

Genetic immunization is attractive in vaccine development [19] has been used to elicit protective antibodies and cell-mediated immune responses in a variety of animal models of viral and bacterial diseases [20,21]. The approach uses a plasmid DNA encoding the protein of interest with a strong eukaryotic promoter system. The antigen is produced *in vivo* and subsequently presented either by MHC class I or MHC class II molecules [22,23].

Since the *mecA* sequence is a unique genetic marker for MRSA and the PBP2a protein is located on the outer surface of the cytoplasmic membrane [1] where it could be recognized by the host immune system, we chose the internal region of the PBP2a protein, comprising the serine-protease domain, to be used as the antigen.

Senna *et al.* (2003), employing a similar strategy, were able to elicit protective antibodies in a murine model [23]. In another study, Ohwada *et al.* (1999) obtained antibodies anti-PBP2a using the whole PBP2a as an antigen, inducing a low level of protection [24].

In the present study we evaluated and purified anti-PBP2a polyclonal antibodies produced in horses immunized with a DNA vaccine, and its specific activity was tested.

2. Material and Methods

2.1. DNA Vaccine

The DNA vaccine used in horse immunization and the recombinant peptide used in the ELISA assay were padronized by our research group and published in ROTH *et al.*(2006)[25].

2.2. Horses immunization schedule

Seven crioulo horse (six mares and one gelding, 3 years (range 2-6) median age, 450 kg (range 430-460) median weight) were included in the study. All animals were previously dewormed with Ivermectin and maintained in pasture supplemented with alfalfa hay and high-protein ration daily. Three days before the first immunization, 0.5% bupivacain chloridrate was injected at a dose of 5 mL/animal in the left quadriceps muscle. The vaccination experiment was conducted using three groups of horses. The treatments administered are shown in Table 1. Blood was collected every week for humoral immune response analysis (Figure 1).

2.3. Anti-MRSA antibodies detection

Specific antibodies levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Microplates wells were coated with 1.0 µg/mL of purified recombinant peptide diluted in 0.1 M carbonate/bicarbonate coating buffer (pH 9.6) and incubated overnight at 4° C. Microplates were washed three times with PBS, 0.05% (v/v) Tween 20 (PBST) and

saturated with 200 μ L of blocking buffer (PBS containing 5% non-fat dried milk) at 37°C for 2h. After blocking buffer removal, 100 μ L of sera were added in triplicate in the microplates, and incubated at 37°C for 2 h. After washing with PBST, 100 μ L of anti-horse (anti-mouse was utilized in mice sample) polyvalent immunoglobulins peroxidase-conjugated diluted 1:500 was added and the microplates were incubated for 90 min at 37°C. After three washes with PBST, 100 μ L of substrate (0.4 mg of *o*-phenylenediamine hydrochloride diluted in 0.2 M citrate/phosphate buffer pH 5.0 containing 0.4 μ L/mL of H₂O₂) was added in the microplates, incubated for 15 min at room temperature and the reaction was stopped by the addition of 50 μ L of 2 M H₂SO₄. Optical density (O.D.) was measured at 490 nm in an automated Spectrometer with a microplate reader Benchmark (Biorad). Controls consisted of microwells without antigen. O.D. values were obtained by subtracting mean O.D. in control wells from mean O.D. in triplicate experimental wells.

2.4 Anti-MRSA horse-antibodies purification and specific activity

After the last immunization, 2 L of blood from the horse with higher anti-MRSA immune response was collected with anticoagulant and maintained at 4°C for 24 h; subsequently, the sera was extracted and stored at 4°C. For purification, 50 mL of sera were utilized. Firstly, 0.04 mL 10% dextran sulphate solution and 1 mL 1 M calcium chloride were added per mL of sample, mixed for 15 min and centrifuged at 10000 x g for 10 min. The supernatant was dialyzed in 0.02 M sodium phosphate buffer pH 7.0 and loaded onto a Hitrap Protein G HP column. The elute with 0.1 M glycine-HCl pH 2.7 of the IgGs was collected in tubes with 60 μ L of 1 M Tris-HCl pH 9.0 per mL of sample. For the last step, the affinity membrane (Sartobind Epoxy 75) coupled with recombinant peptide was employed. The sample was passed through the membrane to purify only anti-PBP2a specific antibodies produced in the horse immunized with DNA vaccine. The specific activity was evaluated using the samples from each step of the antibody purification and measured by ELISA as described above. For protein quantification, the Bradford method [26] was employed.

3. Results

3.1. Animal immunization and humoral immune response evaluation

There were no deaths or signs of inflammation at the site of injection among in the horses during the experiment. We evaluated the presence of specific antibodies anti-PBP2a raised in horses after DNA vaccine immunization with recombinant plasmid by ELISA. The results indicate that in the group vaccinated with recombinant plasmid pCI-neo-*mecA*, all horses were able to produce specific antibodies anti-PBP2a. The major antibodies titers were obtained after third immunizations in horses (Figure 2).

3.2 Purification of anti-PBP2a specific horse antibodies and specific activity

Anti-PBP2a specific horse antibodies purification was proceeded in two steps (Figure 3). The specific activity was approximately 160 times higher in purified equine sera than in crude equine sera (table 2).

4. Discussion

S. aureus is an important community-acquired and nosocomial pathogen [27]. Staphylococcal resistance to first-line drugs, such as synthetic penicillins and against most clinically useful antibiotics have resulted in major problems to treating MRSA strains, which are increasingly common, especially in hospitalized patients [28]. As a result, vancomycin is often the only effective antibiotic remaining. Moreover, recent data have reported the first case of new "superbug" bacteria, which are completely resistant to vancomycin [29].

The development of new antibiotics should be continued since they are of primary importance to maintain the effectiveness of antimicrobial treatment. However, as experience in the past decades has shown, new antibiotics may be effective for only an restrict period and resistance will be developed to each new drug. Accordingly, this serious public health problem may lead one to question whether the antimicrobial era might not be coming to an end. Therefore, alternative methods for prevention and treatment of multi-drug resistant bacterial infections are eagerly sought.

Other methods such as vaccination and passive immunization have been studied as an alternative. In this work, we evaluated the humoral immune response in horses vaccinated with a DNA vaccine containing a fragment of PBP2a. We used this protein as antigen since the *mecA* sequence is a unique genetic marker for MRSA. Moreover, the PBP2a protein is located on the outer surface of the bacterial cytoplasmic membrane, where it may be easily recognized by antibodies raised by the host immune system [1].

We chose the genetic immunization approach because it has been used to elicit antibodies in a variety of animal models of bacterial and viral diseases [20, 21] and DNA vaccines can be administered in a simple and safe manner, are relatively stable, provide long-term protection and are inexpensive and easy to manipulate [30].

Our results demonstrate that horses responses to DNA immunization produced significant levels of specific antibodies. Indeed, the humoral immune response or antibody production, obtained in horses immunized with pCI-neo-*mecA* indicates that the higher antibodies level was obtained after the third immunization. We have recently published a report of protection against MRSA using this new strategy and demonstrated that this DNA vaccine is able to fight this pathogen in animal models [23]. Unfortunately, until now there are numerous barriers to DNA vaccine commercialization.

Because most of nosocomial MRSA infections are accompanied of immunodepression [31], vaccine strategies could be not effective to treat installed MRSA infections. So, in these cases, passive immunotherapy could be a more effective approach. In the preantibiotic Era, passively administered immune animal sera was the primary mode of treatment for many infectious diseases [32,33], however serum therapy was abandoned when antibiotics became widely available in the 1940s. The emergence of antimicrobial resistance has decreased the efficacy and predictability of antimicrobial chemotherapy, and antibodies can again be considered therapeutic alternatives for a variety of infections [33]. Our results showed a large specific activity of the purified anti-MRSA specific horses antibodies. The protocol developed to select the specific MRSA antibodies from horse serum showed very effective, revealing that the activity and the specificity are preserved after purification and that these antibodies may be used in serotherapy against human MRSA sepsis after treatment for cleavage of Fc region.

In conclusion, we were able to demonstrate that DNA immunization against the PBP2a induces the production of specific antibodies in horses and that this strategy can

represent a novel alternative to fight these bacterial infections. Moreover, our results indicate that this approach could be applied to produce antibodies in horses which can be utilized to human serotherapy against MRSA.

References

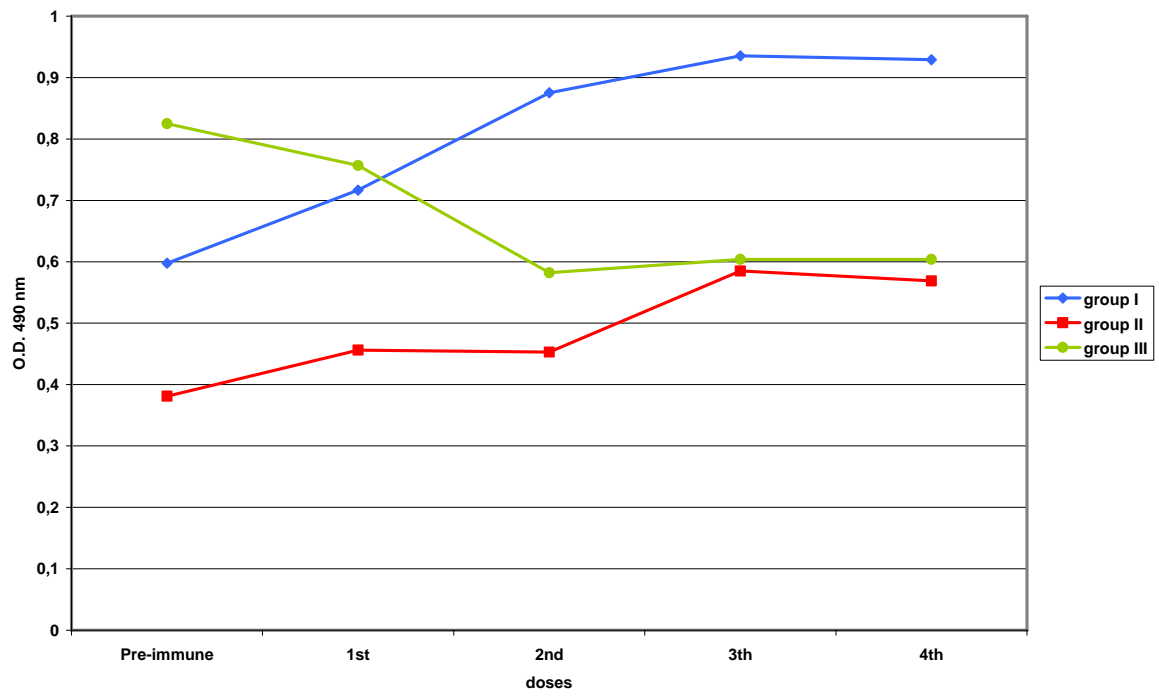
- [1] Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999;63:174-229.
- [2] Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactams accelerated by generations of β -lactams antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997;24:19-45.
- [3] Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. *British Med J* 1961;1:124-125.
- [4] Boyce JM, Causey WA. Increasing occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States. *Infect Control* 1982;3:377-383.
- [5] Boyce JM, White RL, Spruill EY. Impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the incidence of nosocomial Staphylococcal infections. *J Infect Dis* 1983;148:763.
- [6] Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997;350:1670-1673.
- [7] Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:135-136.
- [8] Centers for Diseases Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48:707-710.
- [9] Centers for Diseases Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:565-567.
- [10] Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999;340:493-501.
- [11] Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, Perl TM, et al. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. *Clin Infect Dis* 2003;36:429-439.

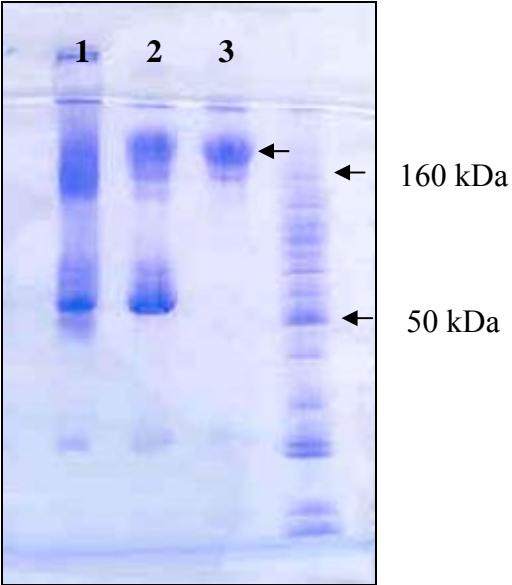
- [12] Howe RA, Monk A, Wootton M, Walsh TR, Enright C. Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Emerging Infect Dis* 2004;10: 855-857.
- [13] Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med* 2003;348:1342-1347.
- [14] Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, et al. Genetic analysis of a High-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003;302:1569-1571.
- [15] Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2001;1:147-155.
- [16] Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001;9:486-493.
- [17] Matsushashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1986;167:975-980.
- [18] Hiramatsu K, Cui L, Kuwahara-Arai K. Has vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* started going it alone? *The Lancet* 2004;364:565-566.
- [19] Laddy DJ, Weiner DB. From plasmids to protection: a review of DNA vaccines against infectious diseases. *Int Rev Immunol* 2006;25(3):99-123.
- [20] Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1999;15:617-648.
- [21] Tuteja, R. DNA vaccines: a ray of hope. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1999;34:1-24.
- [22] Condon C, Watkins SC, Celluzi CM, Thompson K, Falo LDJ. DNA based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Med* 1996;2:1122-1128.
- [23] Senna JPM, Roth DM, Oliveira JS, Machado DC, Santos DS. Protective Immune Response against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in a Murine Model Using a DNA Vaccine Approach. *Vaccine* 2003;21(19-20):2661-6.
- [24] Ohwada A, Sekiya M, Hanaki H, Arai KK, Nagaoka I, Hori S, et al. DNA vaccination by *mecA* sequence evokes an antibacterial immune response against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1999 44(6):767-74.

- [25] Roth DM, Senna JPM, Machado, DC. Evaluation of the humoral immune response in BALB/c mice immunized with a naked DNA vaccine anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Genet Mol Res 2006; 5(3):503-512.
- [26] Bradford MM, McRorie RA, Williams WL. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, Anal Biochem 1976;72:248–254.
- [27] Sheagren JN. *Staphylococcus aureus*: The persistent pathogen. N Engl J Med 1984;310:1368-1373, 1437-1442.
- [28] McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Döring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB. Broadly Protective Vaccine for *Staphylococcus aureus* Based on an in Vivo-Expressed Antigen. Science 1999;284:1523-1527.
- [29] Pearson H. Bacteria defies last-resort antibiotic. Nature-Science update, 2002.
- [30] Babiuk LA, Babiuk SL, Loehr BI, Van Drunnen Littel-van den Hur, S. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. Vet Immunol Immunopathol 2000;76(1-2):1-23.
- [31] Griebble HG, Krause SA, Pappas SA, Dicostanzo MB. The prevalence of high-level methicillin resistance in multiply resistant hospital staphylococci. Medicine 1981;60:62-69.
- [32] Christian HA. The principles and practice of medicine. New York:Appleton-Century Company Inc., 1944. [32] Christian HA. The principles and practice of medicine. New York:Appleton-Century Company Inc., 1944.
- [33] Casadevall A, Scharff MD. Serum Therapy Revisited: Animal Models of Infection and Development of Passive Antibody Therapy. Antimicrob Agents Chemother 1994;38(8):1695-1702.

days 0 1 4 11 17 18 24 31 31 38 46 47 53 60







Legend to Figures.

Figure 1. Diagram showing the immunization schedule. Sera collection during DNA vaccination. ♣, collection of pré-immune sera; ▲, bupivacain; ■, collection of immune sera; ✕, DNA vaccine, ✱, booster.

Figure 2. Presence of anti-PBP2a antibody in the sera obtained after 15 days after each immunization, during experiment of horses immunized with DNA vaccine. Group I received 3 mg of pCIneo-*mecA*, group II received 3 mg of the empty pCIneo plasmid and group III received only PBS.

Figure 3. SDS PAGE 10-15% showing each step of purification antibodies against MRSA. Line 01: Crude Sera. Line 02: Sample after Protein G column. Line 03: Anti-PLP2a purified. Line 04: BenchMark Protein Ladder (Invitrogen). Each sample was loaded with 1.5 µg protein. Arrows show the PLP2a antibody band of 180 kDa.

Table 1. Immunization schedule and treatment of experimental groups

Group	Number of horses	Vaccine	Dose/horse
I	05	pCI-neo- <i>mecA</i>	3 mg
II	01	pCI-neo	3 mg
III	01	PBS	-

Table 2 – Specific activity of each step of the horse antibody purification

Step/Sample	Protein concentration (mg/mL)	Activity(O.D. 490 nm) Units/mL	Specific Activity (Units/mg)
Crude sera	18.60	10.67	0.57
Step 01: Protein G	1.01	6.34	6.27
Step 02: Membrane Affinity	0.037	3.42	92.4

4. DISCUSSÃO

Tendo como base os objetivos específicos deste projeto, pode-se concluir que o resultado foi alcançado. O primeiro passo deste trabalho, buscou obter uma resposta imune humoral nos eqüinos imunizados com a vacina de DNA que contém um fragmento do gene *mecA*. O uso da vacina de DNA para induzir uma resposta imune em eqüinos já foi relatado em outros estudos (COOK et al., 2005; FOOTE et al., 2005; FISCHER et al., 2003), porém com o objetivo de proteger os próprios animais contra doenças específicas eqüídeas. Neste trabalho, buscamos induzir uma resposta imune-humoral em eqüinos com o objetivo de produzir anticorpos específicos anti-PLP2a para após, purificá-los e avaliá-los em testes de proteção, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, quando desafiados com uma cepa de SARM.

Primeiramente foi instituído um protocolo de imunização nos eqüinos, usando a vacina de DNA construída. Há poucos relatos na literatura científica que utilizam este modelo animal. Sendo assim, para determinar a dose e cronograma de imunização dos eqüinos, foi utilizado o resultado de outro trabalho do nosso grupo (ROTH, 2002), no qual se determinou a dose necessária da vacina de DNA necessária para gerar uma resposta imune humoral em camundongos.

Além da enorme diferença existente entre as duas espécies como o tamanho e o peso foi levado em conta também, que o sistema de criação e o manejo destas espécies foram totalmente diferentes nos dois trabalhos, já que os camundongos foram mantidos sob todas as condições controladas, enquanto os eqüinos foram mantidos a campo, suscetíveis ao contato com agentes do meio ambiente e ao tempo. Portanto, foram necessários ajustes na dose da vacina de DNA aplicada aos cavalos para alcançar uma produção de anticorpos específicos satisfatória (Figura 5 do manuscrito).

Posteriormente, a produção dos anticorpos fez-se necessária à purificação destes para avaliar a especificidade e a atividade destes anticorpos produzidos após as várias etapas de purificação. Como o nosso grupo de trabalho possui larga experiência na purificação de proteínas (OLIVEIRA et al., 2003; SILVA et al., 2003; FONSECA et al., 2005; RIZZI et al., 2005), optou-se, para a purificação dos anticorpos, pelo método de afinidade (VERDOLINA et al., 2002). Empregando um protocolo simples, foi possível purificar os anticorpos anti-PLP2a produzidos nos equinos imunizados com a vacina de DNA (Figura 5 do manuscrito).

Após esta purificação, foi realizado o teste de atividade do anticorpo purificado (tabela 2 do manuscrito). A atividade específica do anticorpo purificado aumentou mais de 160 vezes, quando comparado com a amostra bruta, o que demonstra que, após sua purificação, o anticorpo permanece ativo.

Com estes resultados, foi possível demonstrar a possibilidade de utilizar uma vacina de DNA para a produção de anticorpos específicos em equinos. A grande vantagem desta técnica é que não é necessária a purificação do antígeno protéico para induzir a resposta imune em comparação com as vacinas protéicas tradicionais.

O segundo aspecto é que, se é possível produzir e purificar os anticorpos anti-PLP2a em equinos, isto poderia ser utilizado no tratamento de pacientes acometidos por infecção hospitalar provocada por SARM. Como estes pacientes, na grande maioria das vezes, estão imunossuprimidos, temporariamente, eles não possuem um sistema imune apto para produzir anticorpos contra um antígeno administrado através de uma vacina, portanto, a idéia de se administrar diretamente anticorpos específicos anti-PLP2a vislumbra ser uma alternativa melhor do que aquela de vacinação direta dos pacientes.

Além disso, a utilização de vacina de DNA diretamente em humanos ainda é controversa, o que torna esta idéia de imunidade passiva ainda mais atrativa.

A administração de anticorpos heterólogos em humanos exige alguns cuidados, a fim de se minimizar os efeitos adversos destes, devido principalmente, a falhas na purificação (JONES & LANDON, 2002). Além disso, antes da administração das imunoglobulinas eqüinas em humanos é necessária a clivagem da Fração constante (Fc) do anticorpo eqüino e sua posterior retirada. Normalmente, esta clivagem é realizada pela enzima pepsina, que cliva a imunoglobulina em duas partes: a região variável, também conhecida como F(ab')₂ e a região Fc (JONES & LANDON, 2002). A região F(ab')₂ é a região utilizada na soroterapia e é a região que tem afinidade pelo antígeno. Portanto, a técnica de purificação empregada neste trabalho para purificar o anticorpo integral pode ser a mesma a ser utilizada para purificação apenas da região variável do anticorpo clivado.

Após isso, o passo seguinte deste projeto será testar se os anticorpos anti-SARM purificados são capazes de combater a SARM, através de testes *in vitro* e *in vivo*. Caso isto ocorra, esta tecnologia poderá ser utilizada amplamente na produção de anticorpos para o tratamento de pacientes acometidos com infecção provocadas por SARM.

A SARM surgiu na década de 1960 e hoje é um grande problema de saúde pública mundial. Países europeus estão tendo índices alarmantes de infecção hospitalar causada por essa bactéria e o surgimento de cepas resistentes a vancomicina causou um grande impacto na comunidade médica e científica (WHO, 2000). A busca de alternativas para o tratamento de pessoas acometidas por SARM é urgente. Nossos resultados demonstram que a produção de anticorpos específicos anti-PLP2a em eqüinos imunizados com uma vacina de DNA poderá, ser uma estratégia eficaz no tratamento desta enfermidade, via soroterapia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramson MA and Sexton DJ (1999) Nosocomial methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremia: At what costs? Infect Control Hosp Epidemiol 20: 408-411.

Acuna LG (2003) Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. Rev chi infectol 20(1): 7-10.

Babiuk LA, Babiuk SL, Loehr BI and Van Drunen Littel-Van Den Hurk S. (2000) Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. Vet Immunol Immunopathol 76: 1-231.

Barie PS (2005) Another scourge upon the populace: community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Surg Infect (Larchmt) 6(3): 265-7.

Casadevall A and Scharff MD (1994) Serum Therapy Revisited: Animal Models of Infection and Development of Passive Antibody Therapy. Antimicrob Agents Chemother 38(8): 1695-1702.

Centers for Disease Control and Prevention (1999) Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997-1999. JAMA 282: 1123-5.

Chambers HF (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 10(4): 781-91.

Chang S (2003) Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med 348: 1342-7.

Chippaux JP (1998) The development and use of immunotherapy in Africa. Toxicon 36: 1503-1506.

Cook RF, Cook SJ, Bolin PS, Howe LJ, Zhou W, Montelaro RC and Issel CJ (2005). Genetic immunization with codon-optimized equine infectious anemia virus (EIAV) surface unit (SU) envelope protein gene sequences stimulates immune responses in ponies. Vet Microbiol 108(1-2): 23-37.

Creech CB 2nd, Talbot TR and Schaffner W (2006) Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: The Way to the Wound Is through the Nose. J Infect Dis 193(2): 169-71.

Dailey L, Coombs GW, O'Brien FG, Pearman JW, Christiansen K, Grubb WB and Riley TV (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Western Australia. Emerg Infect Dis 11(10): 1584-90.

Dani SU (2000) Terapia Gênica. *Biotechnol Ciência e Desenvolvimento*: 28-33.

De Jonge BL, Sidow T, Chang YS, Gage D and Tomasz A (1993) Altered mucopeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated *femA* locus. *J Bacteriol* 175: 2779-2782.

Diederer BM and Kluytmans JA (2005) The emergence of infections with community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect article in press*.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Disponível em: <http://www.rivm.nl/earss/> Acesso em: 22.10.2005.

Fischer L, Minke J, Dufay N, Baudu P and Audonnet JC (2003). Rabies DNA vaccine in the horse: strategies to improve serological responses. *Vaccine* 21(31): 4593-6.

Fonseca IO, Magalhaes ML, Oliveira JS, Silva RG, Mendes MA, Palma MS, Santos DS and Basso LA (2005) Functional shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Purification and characterization. *Protein Expr Purif Article in press*

Foote CE, Love DN, Gilkerson JR, Rota J, Trevor-Jones P, Ruitenberg KM, Wellington JE and Whalley JM (2005) Serum antibody responses to equine herpesvirus 1 glycoprotein D in horses, pregnant mares and young foals. *Vet Immunol Immunopathol* 05(1-2): 47-57.

Goldstein FW and Acar JF (1996) Historique, importance clinique et impact socio-économique de la résistance à la métilicine. In: *Les Staphylocoques dorés résistants à la métilicine*. Rhône-Poulenc Rorer-Belou France, pp 7.

Gordon A and Ramshaw I (2003) DNA vaccination. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 8(1): 27-35.

Hiramatsu K (2001) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 1(3): 147-55.

Hiramatsu K, Cui L and Kuwahara-Arai K (2004) Has vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* started going it alone? *The Lancet* 364: 565-566.

Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T and Tenover FC (1997) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40: 135-136.

Hsu LY, Koh TH, Tan TY, Ito T, Ma XX, Lin RT and Tan BH (2006) Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Singapore: a further six cases. *Singapore Med J* 47(1): 20-6.

Jevons MP (1961) Celbenin-resistant Staphylococci. *Br Med J* 1: 124-125.

Jones RG and Landon J (2002) A protocol for 'enhanced pepsin digestion': a step by step method for obtaining pure antibody fragments in high yield from serum. *J Immunol Methods* 275(1-2): 239-50.

Karlson-Stiber C, Persson H, Heath A, Smith D, al-Abdulla IH and Sjostrom L. (1997) First clinical experiences with specific sheep Fab fragments in snake bite. Report of a multicentre study of *Vipera berus* envenoming. *J Intern Med* 241(1): 53-8.

Lutz L, Matos SB, Kuplich N, Machado A and Barth AL (1999) Características laboratoriais de *Staphylococcus aureus* isolado de paciente que não respondeu ao tratamento com vancomicina. Primeiro Encontro de Controle de Infecção Hospitalar do Mercosul, Canela, RS, 1999.

Ohwada A, Sekiya M, Hanaki H, Arai KK, Nagaoka I, Hori S, Tominaga S, Hiramatsu K, Fukuchi Y (1999). DNA vaccination by *mecA* sequence evokes an antibacterial immune response against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 44(6): 767-74.

Oliveira JS, Mendes MA, Palma MS, Basso LA and Santos DS (2003) One-step purification of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif* 28(2): 287-92.

Pearson H (2002) Bacteria defies last-resort antibiotic. *Nature-Science update*.

Powers JH (2004) Antimicrobial drug development – the past, the present, and the future. *Clin Microbiol Infect* 10(4): 23-31.

Rizzi C, Frazzon J, Ely F, Weber PG, da Fonseca IO, Gallas M, Oliveira JS, Mendes MA, de Souza BM, Palma MS, Santos DS and Basso LA (2005) DAHP synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and purification of functional enzyme. *Protein Expr Purif* 40(1): 23-30.

Roberts JC, Krueger RL, Peak KK, Veguilla W, Cannons AC, Amuso PT and Cattani J (2006) Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic Clone USA300 in Isolates from Florida and Washington. *J Clin Microbiol* 44(1): 225-6.

Roth DM (2002) Avaliação da resposta imune humoral em camundongos imunizados com uma vacina de DNA anti-PLP2a de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Dissertação de Mestrado, PPGBCM-UFRGS.

Ruffino-Netto A (2002) Tuberculosis: the neglected calamity. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 51-58.

Santos DS (1996) Antimicrobianos: Mecanismos de ação e mecanismos de resistência em bactérias e vírus. In: Soares PRB and Bertuol M (eds.) Infecções clínico-cirúrgicas em ginecologia. Artes Médicas, Porto Alegre, RS, pp 49.

Silva RG, Carvalho LP, Oliveira JS, Pinto CA, Mendes MA, Palma MS, Basso LA and Santos DS (2003) Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase. *Protein Expr Purif* 27(1):158-64.

Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Stedward CD, Stocker SA, Hancock GA, O'Hara CM, Clark NC and Hiramatsu K (1998) Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* 36(4): 1020-1027.

Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB and Dunman PM (2006) Characterization of a Strain of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Widely Disseminated in the United States. *J Clin Microbiol* 44(1): 108-18.

Verdoliva A, Pannone F, Rossi M, Catello S and Manfredi V (2002) Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. *J Immunol Methods* 271(1-2): 77-88.

Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P and Jani A (1992) Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Human Molecular Genetics* 1: 363-369.

World Health Organization (2000) WHO Report on infectious diseases 2000, Geneva, Switzerland, WHO/CDS/2000.2.

Zhu D, Rice J, Savelyeva N and Stevenson FK (2001) Fusion Vaccines against B-cell tumors. *Trends in Mol Med* 7(12): 566-572.