

**UTILIZAÇÃO DE MODELO BIOLÓGICO EXPERIMENTAL NA AÇÃO
SORONEUTRALIZANTE DE TOXINFECÇÃO SISTÊMICA POR CEPA DE
*Staphylococcus pseudintermedius***

(SERONEUTRALIZATION ACTION OF A SYSTEMIC TOXICO-INFECTION CAUSED BY
Staphylococcus pseudintermedius ON BIOLOGICAL EXPERIMENTAL MODEL)

**C. SOUZA¹, J. F. G. WARTH¹, J. V. B. AGOTTANI², J. MOURA¹, R. P. MALUTA³,
M. V. CARDOZO³, F. A. ÁVILA³**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a proteção conferida por soro hiperimune policlonal contra a toxinfecção intraperitoneal por *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*) utilizando como modelo biológico experimental camundongos passivamente imunizados pela via intraperitoneal com 0.5 mL de soro canino com título 512 de anti-hemolisina Beta a qual foi considerada como marcadora da expressão fenotípica de virulência tóxica. Para realização do experimento foram constituídos dois grupos de animais (I e II) compostos por 32 camundongos (*Mus musculus*) cada um, tendo o grupo controle (II) recebido igual volume de solução fisiológica pela mesma via. Os dois grupos foram desafiados com inóculo contendo $2,5 \times 10^{10}$ U.F.C. diluídas em caldo BHI com 16 UH (Unidades Hemolíticas) de toxina Beta, correspondente a 1.5 DL₅₀. O índice de sobrevivência foi avaliado 24 horas após o início do experimento alcançando 97% no grupo I e 33% no grupo II. A avaliação da eficácia soroterápica antitóxica, medida pela Fração Evitável, alcançou índice de proteção de 87%. No grupo imunizado passivamente, observou-se a presença bacteriana nos lavados peritoneais durante todo o experimento. As contagens bacterianas no baço dos animais imunizados apresentaram tendências decrescentes até as 84 horas após o desafio. A partir de 108 horas após o desafio observou-se no grupo I a formação de pequenos abscessos localizados principalmente na superfície hepática, linfonodos mesentéricos, peritônio parietal e diafragma. A proteção conferida pelo soro hiperimune policlonal desempenhou um papel importante em relação aos fatores de virulência toxigênicos do *S. pseudintermedius*. Apesar da constante presença bacteriana na cavidade peritoneal dos animais imunizados, a neutralização das toxinas possibilitou a sobrevivência dos animais desafiados demonstrando o importante papel das mesmas na virulência do *S. pseudintermedius*, principal agente etiológico nas piодermites caninas. Face aos resultados de proteção obtidos neste modelo biológico, a utilização terapêutica de soro hiperimune em pacientes imunocomprometidos ou a utilização de um toxoide em infecções localizadas poderão se tornar uma alternativa viável no controle destas toxinfecções em cães.

PALAVRAS-CHAVE: Modelo biológico. *Mus musculus*. Soro neutralização. *Staphylococcus pseudintermedius*. Toxoide.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate how effective the antitoxic hyperimmune serum is against intraperitoneal toxinfecction caused by *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*) on mice passively immunized with 0.5 mL of canine polyclonal serum with 512 anti-hemolysin Beta titer, which was considered the phenotypical marker of toxic virulence. Sixty-four mice (*Mus musculus*) were divided in two groups (I and II) with 32 mice each, one of which, the control group (II) received equal volume of physiologic saline solution by the same route. Both challenged groups received inoculum with $2,5 \times 10^{10}$ C.F.U. diluted in broth with 16 HU (Hemolytic Units) of Beta toxin, corresponding to 1.5 DL₅₀. The survival index was evaluated 24 hours after the initial experiment, and reached 97% and 33% in group I and II, respectively. The evaluation of the antitoxic serotherapy efficacy, measured by Preventable Fraction, showed a protection index of 87%. In the passively immunized group, the presence of bacteria in the peritoneal fluid was observed during the whole experiment. The bacterial counts in the spleen of immunized animals showed decreasing tendency up to 84 hours after the challenge. At necropsy, small abscesses localized mainly on the liver surface, mesenteric lymph nodes, parietal peritoneum and diaphragm were observed in mice of group I, 108 hours after the challenge. The protection conferred by the polyclonal hyperimmune serum played an important role with respect to

¹Universidade Federal do Paraná * autor para correspondência: cybelle@ufpr.br

²Instituto de Tecnologia do Paraná, TECPAR – Curitiba

³Departamento de Patologia Veterinária, FCAV – Unesp, Jaboticabal

toxigenic virulence factors of this bacterium. In spite of the constant bacterial presence in the peritoneal cavity of passively immune animals, the neutralization of toxins allowed the survival of challenged animals showing their important role in the virulence of *S. pseudintermedius*, the main etiologic agent of canine pyoderma. Based on the results of this biological model, the therapeutic use of hyperimmune serum in immune-compromised patients as well as the preventive use of a toxoid vaccine can be a viable alternative to control these toxic infections in dogs.

KEY-WORDS: Biological model. *Mus musculus*. Serum neutralization. *Staphylococcus pseudintermedius*.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são comumente encontradas na mucosa nasofaríngea e pele podendo infectar quaisquer outros locais do organismo quando as barreiras de defesa inatas são sobrepujadas ganhando acesso a corrente sanguínea e linfática. *Staphylococcus pseudintermedius* tem sido isolado frequentemente de hemoculturas de cães com bacteremia, devido a discospondilites e endocardites. No entanto as fontes bacterêmicas mais comuns incluem abscessos, ferimentos profundos e piodermites (CALVERT & WALL, 2006). As infecções cutâneas representam uma grande porcentagem dos casos atendidos na clínica médica de cães. Em estudo realizado por Scott & Paradis (1990) 25,3% das dermatoses investigadas tiveram participação infecciosa. A espécie *S. pseudintermedius* representam o principal microrganismo isolado das lesões cutâneas em cães (HAUSCHILD & WÓJCIK, 2007). Na maioria dos casos, doenças subjacentes tais como alergias, ectoparasitoses, seborréia e hipotireoidismo levam ao desequilíbrio do microambiente da pele permitindo a infecção secundária por estirpes virulentas de *S. pseudintermedius* (SCOTT *et al.*, 2001). Numerosas enzimas e toxinas estão envolvidas na sua patogênese destacando-se entre estas a catalase e as hemolisinas ao inibirem a fagocitose pelos polimorfonucleares. O recrutamento de neutrófilos e sua ação fagocítica são etapas críticas na resolução de infecções bacterianas (CAMPBELL, 1976). Mólne *et al.* (2000) demonstraram a importância destas células na eliminação bacteriana de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) em casos de infecções cutâneas em camundongos. Por outro lado, foi comprovado que a hemolisina Beta produzida pelo *S. aureus* exerce ação citotóxica sobre diferentes tipos de células eucariotas, incluindo leucócitos (WISEMAN, 1968). Segundo Carlotti (2003), no exame citológico das piodermites superficiais são visualizados neutrófilos degenerados (núcleos picnóticos e hipersegmentados, inchados e descorados) e livre colonização bacteriana. Presume-se que a atividade fagocítica destas células no foco inicial da infecção não esteja ocorrendo com a eficiência esperada possibilitando frequentemente a instalação de um quadro bacterêmico o que torna, segundo CALVERT & WALL (2006), *S. pseudintermedius* como o principal agente infeccioso isolado de hemoculturas. A hipótese de que alguma ação tóxica esteja atuando sobre estas células de defesa parece plausível. Tendo em vista esta constante observação citopatológica entre os casos de piodermite canina, o presente estudo visou investigar o papel neutralizante

das antitoxinas em infecções produzidas por cepas toxigênicas de *S. pseudintermedius* utilizando o camundongo (*Mus musculus*) como modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais do experimento. Para o desafio foram utilizadas 64 fêmeas adultas de camundongos (*Mus musculus*) provenientes do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), linhagem “Rockefeller” e um cão saudável da raça Beagle (*Canis familiaris*) foi utilizado para a hiperimunização com toxoide de *S. pseudintermedius*.

Origem da cepa de *S. pseudintermedius*. Para a obtenção do soro policlonal hiperimmune canino e desafio dos camundongos foi escolhida uma cepa de *S. pseudintermedius* produtora de hemolisina Beta isolada de cão com piodermite, identificada através da morfologia colonial, expressão da dupla hemólise em ágar sangue de ovino, prova da catalase, coagulase ligada, produção de acetoina e fermentação do manitol, de acordo com Greene & Lämmner (1993). A cepa foi denominada no presente estudo de cepa 66.

Obtenção do toxoide. O toxoide foi obtido após cultivo da cepa 66 em 400 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion-Himedia) a 37°C durante 10 dias em frasco do tipo Erlenmeyer, sendo a hemolisina Beta escolhida como marcador da expressão fenotípica de virulência tóxica. Após este período, o cultivo foi centrifugado a 6000 g durante 15 minutos obtendo-se sobrenadante límpido o qual foi filtrado em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Millipore). A titulação da atividade hemolítica da hemolisina Beta foi realizada de acordo com Adlam *et al.* (1977). O filtrado bacteriano da cepa 66 apresentou 16 UH (Unidades Hemolíticas) e dosagem protéica correspondente a 6,3 g.L⁻¹ segundo a metodologia de Lowry (1951). Um volume de 150 mL do filtrado foi congelado a -20°C para posterior análise do perfil protéico pela técnica de SDS-PAGE. O filtrado foi fracionado em volumes de 5 mL e submetido à liofilização sendo estocado a 4°C. Para a obtenção do toxoide, o liofilizado foi ressuspenso em 5 mL de solução salina fenolada a 6% e incubado a 37°C durante 5 dias para a sua inativação (CARTER, 1969). Após este período, a verificação da inativação da hemolisina Beta foi realizada utilizando discos esterilizados de papel filtro embebidos com 50 µL do filtrado, sendo os mesmos depositados sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar sangue ovino, incubadas a 37°C em câmara úmida durante 48 horas. Como controle

positivo da hemolisina Beta, foi utilizada hemolisina Beta comercial (Beta toxin, Hardy Diagnostic, USA).

Obtenção do inóculo (células bacterianas e toxinas) para o desafio. O inóculo obtido consistiu de um cultivo da cepa 66 em frasco de Erlenmeyer contendo 150 mL de caldo BHI incubado a 37°C durante 72 horas em cultivo estático contendo $9,7 \times 10^{10}$ U.F.C. mL⁻¹. Após este período, 16 mL do caldo com cultivo bacteriano foram utilizados para ressuspender o filtrado liofilizado previamente obtido.

Perfil protéico eletroforético pela técnica de SDS-PAGE. As exoproteínas estafilocócicas obtidas no filtrado do cultivo foram dosadas segundo Lowry (1951). A precipitação das mesmas foi realizada segundo Adlam *et al.* (1977) e separadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) em 10% de poliacrilamida e em 5% de gel concentrador com sistema descontínuo de acordo com Laemmli (1970). As proteínas no gel foram coradas com Azul de Coomassie.

Obtenção de soro policlonal hiperimune canino e teste de neutralização da hemolisina Beta. Para obtenção do soro policlonal hiperimune foi escolhido um cão saudável com título de 32 de anti-hemolisina Beta. Foram realizadas três imunizações subcutâneas de 1 mL cada com toxóide em intervalos de 21 dias entre elas. Quinze dias após a terceira imunização, foram colhidos assepticamente, em duas ocasiões distintas, com uma semana de intervalo entre as colheitas, 25 mL de sangue total, para obtenção do volume de soro necessário para as imunizações. O teste de neutralização da hemolisina Beta com o soro hiperimune foi realizado de acordo com Colque-Navarro (1998) utilizando sangue desfibrinado de ovino como indicador de hemólise.

Imunização passiva e desafio em camundongos. Utilizou-se o modelo biológico, com modificações, segundo Menzies & Kernodle (1996). Vinte e quatro horas antes do desafio, 32 camundongos do Grupo I receberam pela via intraperitoneal 0,5 mL de soro de cão hiperimunizado com toxóide da cepa 66, enquanto que o Grupo II (controle), com igual número de animais, recebeu, pela mesma via, igual volume de solução fisiológica estéril. O inóculo para o desafio intraperitoneal foi de 0,25 mL para cada camundongo consistindo de $2,5 \times 10^{10}$ U.F.C. de *S. pseudintermedius* correspondente à aproximadamente 1,5 DL₅₀.

Avaliação da eficácia soroterápica. A Fração Evitável antitóxica foi avaliada utilizando-se a seguinte equação de Abbott, citada por Cardella & Kolbe (1976), sendo considerados somente aqueles animais sobreviventes, de ambos os grupos, após 24 horas da inoculação:

x 100

Colheita do lavado peritoneal e contagens bacterianas. Os lavados peritoneais de quatro camundongos de cada grupo foram colhidos de acordo com Abe *et al.* (1979) em intervalos de tempos variáveis (6, 12, 36, 60, 84, 108, 156 e 204 horas) após

o desafio. Foram realizadas diluições seriadas logarítmicas de base 10 a partir de 1 mL do lavado para os procedimentos das contagens bacterianas. Cada diluição foi semeada em duplicata no volume de 0,1 mL na superfície de placas de ágar Manitol (Himedia) com auxílio de alça de Drigalski. As placas assim processadas foram incubadas a 37°C durante 48-72 horas. Colônias brancas, não fermentadoras do Manitol, com características típicas da espécie foram consideradas nas contagens totais de UFC/mL⁻¹ como *S. pseudintermedius*.

Colheita de baço e contagens bacterianas. Os baços foram colhidos em igual número e intervalo de tempo realizados nas colheitas de lavado peritoneal, sendo lavados duas vezes em solução fisiológica esterilizada e, logo a seguir, triturados em 4 mL de mesma solução, com auxílio de pistilo e gral de porcelana com areia esterilizada. A partir de 1 mL do homogeneizado foram realizadas diluições seriadas, sementeiras e contagens totais de UFC/baço seguindo as interpretações e os parâmetros já citados.

Análise estatística. Os valores encontrados foram submetidos ao ANOVA e, quando significativos, foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Além disso, os dados foram submetidos ao teste t (software Statview). As médias das contagens em UFC de cada colheita e o respectivo desvio padrão também foram calculados.

Comitê de Ética e Experimentação Animal. O presente trabalho foi submetido e certificado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná tendo sido Aprovado segundo processo 23075.034859/2007-29 em 9 de outubro de 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Doenças causadas por bactérias causadoras de toxinfecções são prevenidas por meio de vacinas do tipo toxóide ou anatoxinas notabilizando-se neste sentido as infecções causadas pelo gênero *Clostridium* e *Corynebacterium pyogenes* (CARDELLA & KOLBE, 1976; ALOUF, 1982). A maioria dos imunógenos produzidos para combater infecções provocadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* utilizou células bacterianas ou lisados (CHAMBERS & SEVERIN, 1984; GREENBERG *et al.*, 1987; DeBOER *et al.*, 1990; CURTIS *et al.*, 2006). Por outro lado, são raras as referências empregando-se apenas toxóides estafilocócicos (ADLAM *et al.*, 1977; MENZIES & KERNODLE, 1996). O modelo biológico preconizado por Menzies & Kernodle (1996) foi utilizado no presente experimento com o objetivo de provocar uma toxinfecção intraperitoneal nos animais desafiados com células bacterianas viáveis e toxinas pré-formadas *in vitro*. Deste modo, poder-se-ia avaliar o potencial neutralizante do soro hiperimune no grupo imunizado e o papel das toxinas nas infecções por *S. pseudintermedius* no grupo controle. Caso as toxinas desempenhassem um papel secundário e menos importante num quadro infeccioso intraperitoneal,

haveria em ambos os grupos desafiados número semelhante de óbitos por peritonite septicêmica. Na atual pesquisa o perfil protéico eletroforético em SDS-PAGE do caldo toxigênico utilizado nas inoculações em camundongos apresentou um perfil com aproximadamente 15 bandas, confirmando a presença de múltiplas exoproteínas que poderiam exercer um papel sinérgico na produção de um quadro de uma toxinfecção septicêmica. A partir da inativação deste caldo toxigênico, após três inoculações em cão sadio, obteve-se soro hiperimune utilizado no experimento de imunidade passiva dos camundongos. A proteção antitóxica conferida protegeu os camundongos desafiados com 1,5 DL₅₀ correspondente a de 2,5 x 10¹⁰ U.F.C. de *S. pseudintermedius* e 16 U.H de hemolisina Beta. A sobrevivência e controle da toxinfecção nos animais mantiveram-se até o final do experimento impedindo a forma toxi-septicêmica da infecção. A eficácia soroterápica foi comprovada utilizando-se a equação de Abbot, sendo considerados somente os animais sobreviventes após 24 horas do início do experimento, excluindo-se 16 animais (oito de cada grupo), correspondente às eutanásias executadas nas primeiras 12 horas para os procedimentos das contagens bacterianas do lavado peritoneal e do baço. Entre os 24 animais restantes pertencentes ao Grupo I (imunizados) foram observadas apenas duas mortes durante as primeiras 24 horas do início do experimento obtendo-se um percentual de 91,6% de sobreviventes. Em relação ao Grupo II (controle) foram observadas 16 mortes neste mesmo período obtendo-se um percentual de 33,3% de sobreviventes. Assim, aplicando-se a fórmula obteve-se eficácia soroterápica de 87%. Segundo Tizard (1998) as eficácias vacinais acima de 70% são consideradas satisfatórias para proteção. A fração evitável proporcionada pelas vacinas varia de acordo com o laboratório e metodologia utilizados apresentando diferentes graus de eficiência (GREENE & SCHULTZ, 2006). Os sinais clínicos mais comumente observados no Grupo II após a inoculação foram: anorexia, pelos arrepiados, respiração abdominal e prostração, típicos de infecções septicêmicas. No Grupo I não foram observadas as mesmas alterações, a não ser anorexia nas primeiras 12 horas, retornando a normalidade após este período.

A presença bacteriana nos lavados peritoneais persistiu por 204 horas e nos baços do grupo passivamente imunizado por 156 horas, sugerindo que a ausência de mortalidade nestes períodos deveu-se à proteção antitóxica (Figura 1 e 2). Diferenças significativas no lavado peritoneal foram verificadas apenas às 12 horas após o desafio em relação ao grupo controle (Figura 1).

Observou-se a partir de 108 horas após o desafio dos animais vacinados a formação de pequenos abscessos na cavidade abdominal, localizados principalmente no fígado, peritônio parietal, diafragma e nos linfonodos mesentéricos em todos os animais. Exames bacterioscópicos e a cultura dos abscessos comprovaram a presença do *S. pseudintermedius* nestes focos. O profuso infiltrado de células polimorfonucleares visualizado nestes focos sugere que as células fagocitárias, após o período acima citado,

estavam removendo os microrganismos da cavidade peritoneal, enclausurando-os na forma abscedante e impedindo a forma septicêmica comprovada pela completa eliminação bacteriana do baço. Em pesquisa similar, a presença destes abscessos intraperitoneais foi também verificada por Menzies & Kernodle (1996) ao imunizar passivamente camundongos contra a toxina alfa de *S. aureus*. Segundo Cox (2006), vários fatores de virulência podem contribuir para a inibição da atividade fagocítica prejudicando uma eficaz resposta imune do hospedeiro.

Sabe-se que entre as infecções estafilocócicas mais comuns em cães estão as piodermites cujos exames citológicos revelam profusa colonização por *S. pseudintermedius*, e a presença de neutrófilos degenerados e cocos extracelulares (IRKE, 2006). É possível que em animais cronicamente infectados, a resposta imune humoral antitóxica não seja suficientemente eficaz devido a um processamento inadequado das toxinas por parte das células apresentadoras destes antígenos o que mantém a infecção renitente. Portanto, a utilização de soros hiperimunes antitóxicos seria uma alternativa viável em animais imunocomprometidos, em risco séptico ou piodermites recidivantes.

Por outro lado, a utilização preventiva deste imunógeno contendo as várias toxinas na forma inativada, em altas concentrações proteicas, provocaria uma eficiente modulação da resposta imune humoral contra infecções futuras causadas pelo *S. pseudintermedius*, possibilitando a estimulação adequada com a subsequente produção de anticorpos neutralizantes.

CONCLUSÕES

A utilização de um soro hiperimune ou de um toxoide produzido pelo *S. pseudintermedius* na terapia e prevenção no controle das infecções causadas por este microrganismo poderá ser promissora tendo em vista a eficácia soroterápica antitóxica obtida neste estudo utilizando camundongos como modelo biológico experimental. A escassez de pesquisas referentes ao papel desempenhado pelas exotoxinas expressadas *in vivo* pelo *S. pseudintermedius* justifica a necessidade de maiores investigações das mesmas na patogênese provocada por esta bactéria com o objetivo de aprimorar a eficácia dos imunógenos disponíveis comercialmente.

REFERÊNCIAS

- ABE, K.; HONMA, S.; ITO, T. Peritoneal cells in mice: quantitative and qualitative cell morphology. **American Journal of Anatomy**, New York, v.156, p.37-50, 1979.
- ADLAM, C.; WARD, P. D.; McCARTNEY, A. C.; ARBUTHNOTT, J. P.; THORLEY, C. M. Effect of immunization with highly purified alpha- and beta-toxins on staphylococcal mastitis in rabbits. **Infection**

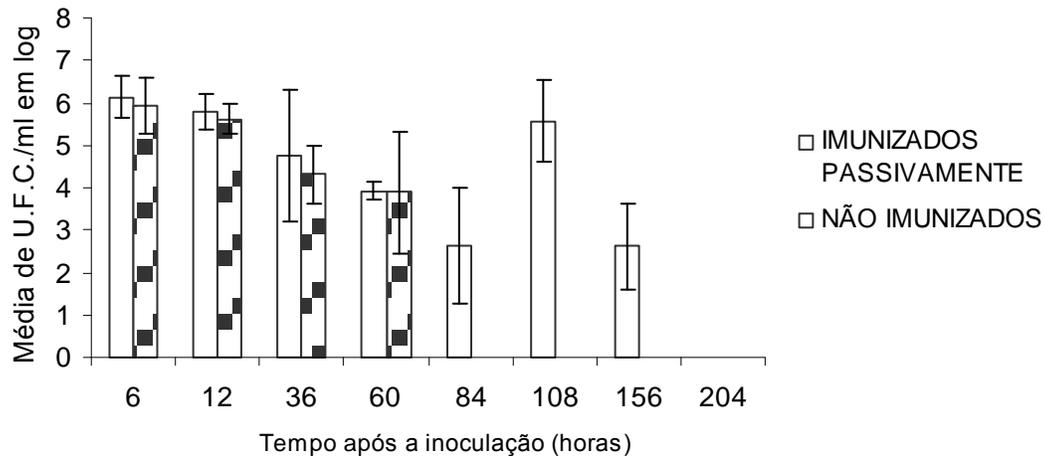


Figura 1 - Cinética de eliminação bacteriana sistêmica (baço) em camundongos desafiados intraperitonealmente com inóculo toxinfecioso de *S. intermedius*.

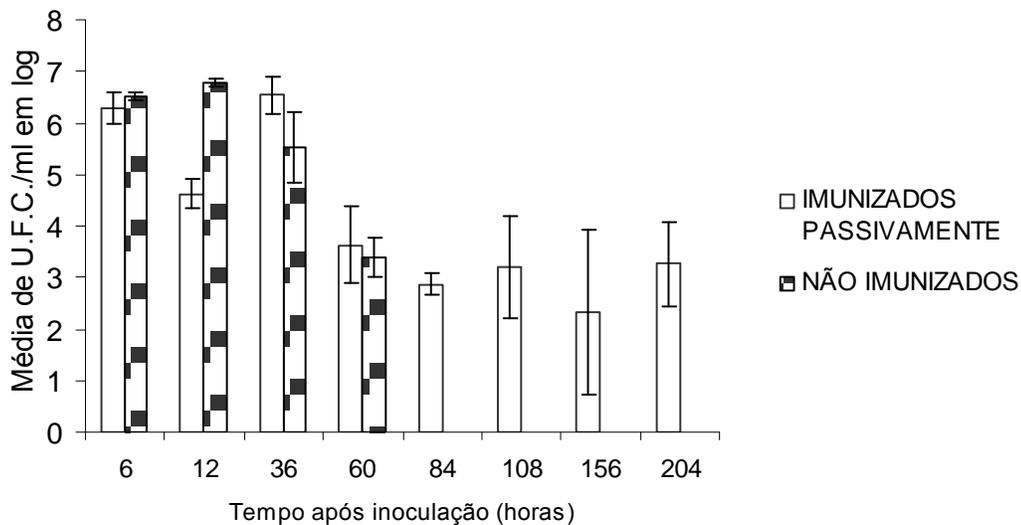


Figura 2 - Cinética de eliminação bacteriana do lavado peritoneal em camundongos desafiados intraperitonealmente com inóculo toxinfecioso de *S. intermedius*. O asterisco indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

and Immunity, Washington, v.17, n.2, p.250-256, 1977.

ALOUF, J. E. Toxines protéiques. In: Minor, L. le; Véron, M. **Bactériologie Médicale**. Paris: Flammarion Médecine Sciences, 1982. Chapitre 9, p.135-180.

CALVERT, C. A.; WALL, M. Cardiovascular Infections. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of**

the dog and cat. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2006. p.841-865. 9.

CAMPBELL, P. A. Immunocompetent cells in resistance to bacterial infections. **Bacteriological Reviews**, Washington, DC, v.40, n.2, p.284-313, 1976.

CARDELLA, M. A.; KOLBE, D. R. Potency testing of *Clostridium septicum* bacterins in sheep and laboratory animals. In: OIE-IABS SYMPOSIUM, 1975, Paris,

France. **Proceedings...** Paris, France: International Office of Epizootics, 1976. 304p. p.115-122.

CARLOTTI, D. N. **Clinical aspects, diagnosis and therapy of canine pyoderma**. Trabalho apresentado no World Small Animal Veterinary Association, Bangkok, Thailand, 2003.

CARTER, G. R. Preparación de bacterinas. In: _____. **Procedimientos de diagnóstico em bacteriologia y micología veterinárias**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1969. Cap.27, p.236-238.

CHAMBERS, E. D.; SEVERIN, G. A. Staphylococcal bacterin for treatment of chronic staphylococcal blepharitis in the dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.185, n.4, p.422-425, 1984.

COLQUE-NAVARRO, P.; SÖDERQUIST, B.; HOLMBERG, H.; BLOMQUIST, L.; OLCÉN, P. Antibody response in *Staphylococcus aureus* septicemia – a prospective study. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.47, n.3, p.217-225, 1998.

COX, H. U. Staphylococcal Infections. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2006. p.316-320.

CURTIS, C. F.; LAMPORT, A. I.; LLOYD, D. H. Masked, controlled study to investigate the efficacy of a *Staphylococcus intermedius* autogenous bacterin for the control of canine idiopathic recurrent superficial pyoderma. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.17, n.3, p.163-168, 2006.

DeBOER, D. J.; MORIELLO, K. A.; THOMAS, C. B.; SCHULTZ, K. T. Evaluation of a commercial staphylococcal bacterin for management of idiopathic recurrent superficial pyoderma in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.51, n.4, p.636-639, 1990.

GREENBERG, D. P.; WARD, J. I.; BAYER, A. S. Influence of *Staphylococcus aureus* antibody on experimental endocarditis in rabbits. **Infection and Immunity**, Washington, v.55, n.12, p.3030-3034, 1987.

GREENE, C. E.; SCHULTZ, R. D. Immunoprophylaxis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2006. p.1069-1119.

GREENE, R. T.; LÄMMLER, C. *Staphylococcus intermedius*: current knowledge on a pathogen of veterinary importance. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, Berlin, v.40, p.206-214, 1993.

HAUSCHILD, T.; WÓJCIK, A. Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. **Research in Veterinary Science**, London, v.82, p.1-6, 2007.

IHRKE, I. Integumentary infections. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. Chap.85, p.807-823.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

MENZIES, B.E.; KERNODLE, D.S. Passive immunization with antiserum to a nontoxic alpha-toxin mutant from *Staphylococcus aureus* is protective in a murine model. **Infection and Immunity**, Washington, v.64, n.5, p.1839-1841, 1996.

MÖLNE, L.; VERDRENGH, M.; TARKOWSKI, A. Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.11, p.6162-6167, 2000.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. Jr.; GRIFFIN, C. E. Bacterial skin diseases. In: _____. **Muller & Kirk's small animal dermatology**. 6.ed. Philadelphia : W. B. Saunders, 2001. p.274-335.

SCOTT, D. W.; PARADIS, M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: small animal clinic, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.31, n.12, p.830-835, 1990.

TIZARD, I.R. Vacinação e vacinas. In: _____. **Imunologia Veterinária: Uma introdução**. São Paulo: Editora Roca, 1998. Cap.21, p. 273-293.

WISEMAN, G.M. The nature of staphylococcal beta hemolysin. II. Effect on mammalian cells. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.14, n.2, p.179-181, 1968.