UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

PROGRAMA DE PÓS –GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO – FARMACÊUTICA

Área de Tecnologia de Fermentações

Desenvolvimento de antígeno vacinal para *Staphylococcus*
spp na prevenção da piodermite canina

Mary Ellen Matiole

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO – FARMACÊUTICA

Área de Tecnologia de Fermentações

Desenvolvimento de antígeno vacinal para *Staphylococcus*
spp na prevenção da piodermite canina

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE.

Orientada: Mary Ellen Matiole

Orientador: Prof.^o Dr.^o Marco Antônio
Stephano

São Paulo

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Mary Ellen Matiole

Título do trabalho: Desenvolvimento de antígeno vacinal para *Staphylococcus spp* na prevenção da piodermite canina

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof.^o Dr.^o Marco Antônio Stephano

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai Orlando Matiole que sempre priorizou minha educação e à minha saudosa mãe Elisabete Matiole que tanto me incentivou com suas palavras de otimismo e nunca me deixou desistir dos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Marco Antônio Stephano pela oportunidade de crescimento intelectual e científico, pela orientação e paciência durante esses anos de mestrado.

Ao professor Dr. Juarez Fernandez Tavora, médico veterinário no Instituto Butantan, que me apresentou ao meu orientador, além de prontamente nos fornecer sangue de carneiro para os experimentos.

Aos meus pais Elisabete (*in memoriam*) e Orlando, pelo amor, dedicação e por nunca terem me deixado desistir de conquistar meus objetivos.

Ao meu irmão e minha cunhada, Silas e Yasnin, pelo apoio, amizade e carinho.

Aos meus colegas de laboratório, Andréa Parra, Ana Clara, Laura Nascimento, Jony Takao, Marnen Carvalho, Patrícia Guglielmi e Fernanda Abdulak, que sempre estiveram dispostos a ajudar e contribuir com meu trabalho.

Ao Dr. Celso Pereira Caricati e Aline Tojeira Prestia Caricati do Instituto Butantan, que colaboraram com a realização dos testes de atividade da bactéria.

À Flavia de Moura Prates Ong e equipe do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química pela ajuda com os cuidados com os camundongos.

À professora Dra. Gisele Monteiro de Souza pela ajuda ao ceder seu laboratório e equipamento para a realização dos testes com as amostras pela técnica de eletroforese.

Ao professor Dr. Adalberto Pessoa Jr. por ter cedido seu laboratório e equipamento para filtração tangencial.

À secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo apoio durante esse período.

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1	Piodermite Bacteriana Canina	12
1.1.1	<i>Staphylococcus spp</i>	14
1.1.2	Fatores de Virulência do <i>Staphylococcus spp</i>	15
1.2	Tratamento da Piodermite	18
1.2.1	Antibioticoterapia e Resistência Bacteriana	19
1.2.2	Vacinas para Piodermite	19
1.3	A Pele dos Mamíferos	21
1.4	Células do Sistema Imunológico da Pele	24
1.5	Vacinas Intradérmicas	26
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Produção de <i>Staphylococcus intermedius</i>	35
4.1.1	Banco de Células	35
4.1.2	Crescimento Bacteriano	35
4.1.3	Produção de Extrato Bacteriano	36
4.1.4	Recuperação de Proteínas do Sobrenadante por Ultrafiltração.....	37
4.2	Dosagem de Proteína Total pelo Método de Bradford	37
4.3	Caracterização antigênica do lisado bacteriano e do sobrenadante (eletroforese em gel de Poliacrilamida).....	37
4.4	Animais Utilizados.....	38
4.5	Teste de antigenicidade.....	38
4.6	Ensaio Imunoenzimático para Determinação da Antigenicidade do <i>Staphylococcus intermedius</i>	39
4.7	Verificação da produção de exoproteínas (ensaios biológicos).....	40
4.7.1	Teste da Hemólise	40
4.7.2	Teste da Inibição da Hemólise por anticorpo.....	40
4.7.3	Teste da Catalase (redução do peróxido de hidrogênio).....	41
4.7.4	Teste da Inibição da Catalase por anticorpo.....	41
4.7.5	Teste da Coagulase.....	41
4.7.6	Teste da Inibição da Coagulase por anticorpo.....	42
4.8	Citotoxicidade por MTT.....	42
4.9	Análise Estatística	44
5	RESULTADOS	46
5.1	Curva De Crescimento do <i>Staphylococcus Intermedius</i>	47
5.2	Ultrafiltração	47
5.3	Quantificação de Proteínas no Sobrenadante e Precipitado pelo Método de Bradford	48
5.4	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	48
5.5	Teste da Catalase.....	49
5.6	Teste da Coagulase.....	50
5.7	Teste da Hemólise.....	56
5.8	Citotoxicidade por MTT.....	54
5.9	ELISA.....	56
6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÃO.....	62
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	ANEXOS	71

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	“Bovine Serum Albumin”, soro-albumina bovina
CL	Células de Langerhans
DE	Dose Efetiva
DL	Dose Letal
EDTA	“Ethylenediamine tetraacetic acid”, ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” – Teste Imunoenzimático
Fc	Fração cristalizável
GM-CSF	“Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor”, citocina que estimula o crescimento dos leucócitos
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
kDa	Mil Daltons
PBS	“Phosphate Buffered Saline”, tampão fosfato-salino
SDS	“Sodium Dodecyl Sulfate”, Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SPL	Staphage Lysate ®
TNF- α	“Tumor Necrosis Factor alpha”, Fator alfa de necrose tumoral
Tris-HCl	Reagente “tris(hydroxymethyl)aminomethane hidrocloreto”
TSA	“Trypticase Soy Agar”, Agar de soja tripsinado
TSB	“Trypticase Soy Broth”, Caldo de Soja Tripsinado
TSST-1	Toxina um da síndrome do choque tóxico
PVDF	“Poly-vinylidene fluoride”, Polivinilidileno fluoreto
U/ml	Unidades por mililitro
PAMPs	“Pathogen-Associated Molecular Patterns”, padrões moleculares associados a patógenos
PRRs	Padrões de reconhecimento de receptores

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Micrografia eletrônica <i>Staphylococcus aureus</i> Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus aureus	19
FIGURA 2. Pele com pelos (cão). A epiderme é delgada e levemente ondulada. HE, obj. 4x. Fonte: Yager & Wilcock 1994.....	26
FIGURA 3. A barreira física e imunológica da pele (KRISHNA S, MILLER LS, 2012)	27
FIGURA 4. Mecanismos e células envolvidas na resposta imune inata e adaptativa após administração de antígeno vacinal utilizando as rotas intradérmica e intramuscular. Adaptado de Nicolas, JF <i>et al.</i> , 2008	31
FIGURA 5. Curva de crescimento de <i>Staphylococcus intermedius</i> em meio TSB...	51
FIGURA 6. Curva padrão de dosagem de proteína com BSA (albumina sérica bovina)	51
FIGURA 7. Fotografia mostrando a eletroforese utilizando Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare). A- Padrão de peso molecular; B-Precipitado (células); C- Sobrenadante (exoproteínas).....	52
FIGURA 8. Fotografia mostrando o teste de catalase com resultado positivo (esquerda) e controle negativo (direita).....	54
FIGURA 9. Fotografia mostrando o teste da coagulase com resultado positivo (acima) e controle negativo (abaixo).....	55
FIGURA 10. Determinação da Dose Hemolítica 50%.....	57
FIGURA 11. Inibição de 3X a Dose Hemolítica 50%.....	57
FIGURA 12. Comparatividade da Dose Efetiva 50% (Dose Inibitória da Hemólise).....	57
FIGURA 13. Curva de Citotoxicidade do Sobrenadante da Cultura de <i>Staphylococcus spp.</i>	57
FIGURA 14. Inibição da Citotoxicidade por inoculação intradérmica.....	57
FIGURA 15. Inibição da Citotoxicidade por inoculação intraperitoneal.....	57
FIGURA 16. Curva de Titulação por ELISA do Soro dos animais imunizados com sobrenadante de cultura inativado ou bacterina inativada ou sobrenadante associado a bacterina inativada de <i>Staphylococcus spp.</i>	57
FIGURA 17. Título determinado pelo ensaio de ELISA dos soros dos animais imunizados com sobrenadante de cultura inativado ou bacterina inativada ou sobrenadante associado a bacterina inativada de <i>Staphylococcus spp.</i>	57

RESUMO

MATIOLE, M.E. **Desenvolvimento de antígeno vacinal para *Staphylococcus spp* na prevenção da piodermite canina**, 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A piodermite bacteriana afeta cães de todas as idades, podendo ser recorrente por toda a vida. O principal agente etiológico é o *Staphylococcus pseudintermedius*, que é um micro-organismo saprófita da pele, agindo como oportunista frente a alguma fragilidade na barreira imunológica. A imunização dos cães através de uma vacina eficaz tem sido um desafio, pois a vacina comercial atualmente utilizada em clínicas veterinárias é de uso terapêutico e não tem caráter preventivo. Um dos problemas da vacina de uso terapêutico para piodermite é a dependência de um bom diagnóstico diferencial em relação a outras doenças de pele ou sistêmicas que tem como sequelas a erupção cutânea. Os animais que recebem a vacina terapêutica e não a preventiva são os que já apresentam problemas de pele recorrentes e são tratados concomitantemente com antibióticos. O objetivo do presente trabalho é desenvolver um antígeno vacinal com possibilidade de aplicação por via intradérmica de modo a tratar preventivamente a piodermite canina causada por *Staphylococcus spp.*. A via de administração intradérmica tem como finalidade estimular uma resposta imune sistêmica, principalmente por ativação das células dendríticas da derme, de modo a estimular estas células apresentadoras de antígeno no local onde ocorrem as infecções piodérmicas. Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a inoculação intradérmica foram estatisticamente igual, quando comparada com a inoculação intraperitoneal, no que se refere à inibição por anticorpos: da atividade hemolítica, da atividade da catalase, da atividade da coagulase e da atividade citotóxica, bem como na reação antígeno-anticorpo determinado por ensaio imunoenzimático. Este trabalho também demonstra que a melhor formulação do antígeno estafilocócico foi preparado a partir de sobrenadante de cultura diafiltrado por filtração tangencial com “cut off” de 5.000 Da. Outras preparações utilizando somente células bacterianas ou associação de sobrenadante com células bacterianas, apesar de produzirem antigenicidade, apresentaram títulos inferiores do que quando empregado somente sobrenadante de cultura diafiltrado.

Palavras-chave: piodermite, *Staphylococcus*, furunculose, foliculite, vacina

ABSTRACT

MATIOLE, M.E. **Development of vaccinal antigen to *Staphylococcus spp* in the canine pyoderma prevention**, 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The bacterial pyoderma affects dogs of all ages and can be recurrent for a lifetime. The main etiologic agent is *Staphylococcus pseudintermedius*, which is a saprophytic organism of the skin, acting as an opportunistic opposite to some weakness in the immune barrier. The immunization of dogs through an effective vaccine has been a challenge, since currently it has been used commercially in veterinary clinics is therapeutic and has a preventive character. One of the problems of the therapeutic use of the vaccine for pyoderma is dependent on a good differential diagnosis in relation to other skin diseases or systemic consequences which is the rash, so treatment often does not reach its goal. Animals receiving this vaccine are those who already have skin problems again and are receiving concomitant antibiotics. The objective of this study is to develop a vaccine antigen with the possibility of implementing a preventive treatment for canine pyoderma caused by *Staphylococcus spp*: through pre-clinical studies, for use in young and adults, preferably before they develop any type of skin disorder primary or secondary. The administration route is intradermal, stimulating an immune response primarily by dendritic cells to become a barrier to microorganisms, as well as systemic, by the production of antibodies, to last for at least one year until needed in the body booster vaccination. The results presented here demonstrated that the intradermal inoculation was statistically equivalent when compared to intraperitoneal inoculation with regard to inhibition by antibody: of the hemolytic activity, catalase activity, the coagulase activity and cytotoxic activity, as well as antigen-antibody reaction determined by enzyme immunoassay. This work also demonstrates that the best estafilococcico antigen formulation was prepared from the culture supernatant diafiltered by tangential filtration with "cut off" of 5,000 Da. Other preparations using only the bacterial cells or the association of supernatant with bacterial cells, although producing antigenicity, showed lower titles than when used dialyzed culture supernatant alone.

Key words: pyoderma, *Staphylococcus*, furunculosis, furuncle, vaccine.

REVISÃO DE LITERATURA

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PIODERMITE BACTERIANA CANINA

Piodermite bacteriana literalmente significa pus na derme e pode ser superficial, profunda ou dos dois tipos concomitantemente (SCOTT et al., 2006; CURTIS et al., 2006; GEORGIEVA, 2012).

A piodermite superficial típica apresenta pápulas, pústulas, colarinho epidérmico e alopecia, como a foliculite, aparência de “pelos roídos” ou dermatite papular. Também pode haver eritema, exudação e erosões na ausência de pústulas ou colarinhos epidérmicos, incluindo intertrigo, dermatite piotraumática, piodermite mucocutânea e síndrome do supercrescimento bacteriano, que geralmente aparece na região ventral. Pode ser caracterizada por forte odor, prurido, seborréia oleosa, liquenificação, hiperpigmentação e escoriações, mas sem lesões histopatológicas consistentes com piodermite verdadeira. Muitos casos da doença estão associados a alergias. A piodermite profunda apresenta nódulos e úlceras, geralmente secundários à ruptura folicular (furunculose) (WAISGLASS, 2009).

As piodermites recorrentes parecem se resolver com tratamento, porém reincidem 1 a 2 meses mais tarde ou sazonalmente (o que facilita a detecção de uma causa de base) (WAISGLASS, 2009).

As causas primárias principais da piodermite recaem nas deficiências dos mecanismos de defesas da pele, anormalidades cutâneas, metabólicas ou imunológicas (SCOTT, 2001), podendo estar presente a dermatite atópica ou alergia alimentar, que permitem a formação de biofilme e o estabelecimento da bactéria na pele. O supercrescimento bacteriano promove aderência e produção de toxinas, quebrando a barreira e colonizando a pele (CORREIA, 2006). Doença endócrina como hipotireoidismo ou hiperestrogenismo, demodicose, seborréia, dermatite responsiva a zinco ou dermatofitose também podem ser fatores que facilitam o aparecimento da piodermite canina por *Staphylococcus spp.* (DEBOER, 2006; WAISGLASS, 2009). Síndromes de imunodeficiência genética ou adquirida são raras (CORREIA, 2006).

A piodermite bacteriana é um dos problemas de pele mais frequentemente encontrados nos cães, tendo o *Staphylococcus intermedius* como o agente comumente encontrado (SCOTT et al., 2001), mas reconhecido e descrito como uma nova espécie desde 2005, *S. pseudintermedius* (PERRETEN, 2010). Por isso, neste trabalho usaremos o termo

(*pseud*)*intermedius* quando a espécie citada como *S. intermedius* possa ser *S. pseudintermedius*.

Esse microorganismo é considerado um dos agentes causadores de otites externas, piodermites e abscessos. Contudo, outras espécies também podem estar envolvidas nas infecções em cães (HAUSCHILD; WOJCIK, 2007), tais como: o *S. aureus*, que também causa infecções em humanos e ocasionalmente infecções profundas que podem se disseminar pela corrente sanguínea (FOSTER, 2005), e também, em menor escala, o *S. hyicus* (HENDRICKS et al., 2002).

O *S. (pseud)intermedius* é isolado em muitas espécies de animais como: caninos, felinos, equinos, bovinos, caprinos, suínos, pombos, canários, visons, ratos, camundongos e muitas outras espécies. Ele geralmente é considerado comensal da pele dos cães, isolado da pele, nariz, boca, faringe, orelhas, conjuntivas, anus, vagina e prepúcio, mas se comporta como oportunista frente a alguns fatores como: trauma, alergia, endocrinopatia, ectoparasitas, imunodeficiência, entre outros, para que se inicie a infecção (DEBOER, 2006).

Geralmente responde bem a determinados antibióticos, mas a maioria reincide em algumas semanas após o fim do tratamento caso haja uma causa primária não controlada (SCOTT et al., 2006). Assim sendo, é necessária uma investigação através de exames complementares, como raspados de pele, cultura de dermatófitos, histórico completo e exame físico detalhado para eliminar as causas mais comuns de recorrência (DEBOER, 2006).

Há uma necessidade da realização de um maior número de ensaios adequados, cegos, randomizados e controlados que avaliem o tratamento para a piodermite canina. A diferenciação entre piodermite superficial e profunda, bem como seus padrões de resistência são obrigatórios (SUMMERS et al., 2012).

1.1.1 *STAPHYLOCOCCUS SPP*

É provável que as bactérias do gênero *Staphylococcus* tenham sido descritas primeiramente por Ogston, em 1880, que descreveu estes micro-organismos como cocos em forma de cachos e responsáveis por infecções piogênicas (LEVY, 1997).

A nomenclatura de *Staphylococcus intermedius* foi proposta por Hájek, em 1971, para amostras isoladas da cavidade nasal de pombos, cães, visons e cavalos sendo que anteriormente eram consideradas subtipos E e F do *S. aureus* subsp. *aureus*. A individualização dessa espécie baseou-se principalmente na composição do peptidoglicano. A hibridização ADN-ADN confirmou que as amostras constituíam uma espécie diferente do *S. aureus* e a nomenclatura do *S. intermedius* foi para “*Approved Lists of Bacterial Names*” em 1980 (FITZGERALD, 2009).

Em 1974, Baird Parker havia descrito apenas três espécies de importância clínica, utilizando o teste de coagulase como característica diferencial, sendo o *Staphylococcus aureus* o único que se conhecia coagulase-positiva (ver Quadro 1) (LEVY, 1997).

Quadro 1 Comparação entre *S. pseudintermedius* e outros estafilococos. Baseado nas taxas descritas por Devriese et al. (2005)

Característica	<i>S.pseudintermedius</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.intermedius</i>
Catalase	+	+	+
Pigmento	-	+	-
Coagulase	+	+	+
Fator de aglutinação	-	+	D
DNase	+	+	+
B-hemolisina	+	D	+
Hemólise	+	+	+

(+) positivo (-) negativo (D) depende da cepa

Em 2005, uma nova espécie foi descrita, o *Staphylococcus pseudintermedius*, pelas suas características fenotípicas, baseado em técnicas moleculares (PERRETEN, 2010). Os isolados pertencentes ao grupo *S. intermedius* foram divididos em três: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini* (WEESE, 2010).

São bactérias gram-positivas, ou seja, tem parede espessa não estratificada de peptidoglicanos, que conferem rigidez à parede, determinam sua forma e protegem da lise osmótica. Também possuem glicina na

composição de sua parede. Não tem nenhuma membrana externa. (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

Seu diâmetro varia entre 0,5 e 1,5 μm , são imóveis e não formadores de esporos (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

Ao microscópio ótico, aparecem em forma de cacho de uva, mas dependendo da idade da colônia, podem estar isoladas, aos pares, agrupadas em tétrades ou, ainda, em pequenas cadeias (Figura 1) (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

Figura 1 Micrografia eletrônica de colônias de *Staphylococcus aureus*.
Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus>

1.1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DO *STAPHYLOCOCCUS SPP*

Os fatores de virulência são muito importantes, pois criam um meio propício à instalação e disseminação da bactéria no tecido do hospedeiro. Como visto na Tabela 1, a colonização de gengiva de cães por *S. intermedius* ou *S. aureus* apresentam diferenças nos mecanismos de virulência bem como a suscetibilidade a antibióticos.

Tabela 1

Características que distinguem culturas das 2 espécies	<i>S. intermedius</i>	<i>S. aureus</i>
Prevalência na flora gengival de cães	39%	10%
Coagulação de plasma de Coelho em até 4 h	26%	100%
Hemólise de sangue de carneiro em 24h	30%	79%
Fermentação de manitol em 24h	4%	93%
Susceptibilidade à Penicilina G	72%	7%
Susceptibilidade à Oxacilina	100%	100%
Análise de culturas de <i>Staphylococcus</i> da flora gengival de 135 cães. Adaptado de Talan D.A. et al. (1989)		

Segundo ANDERSON (1986), as bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem cápsula polissacarídica resistente à fagocitose. O ácido teicóico é capaz de ativar o complemento por via alternativa, aumentando a virulência e a capacidade de invasão dos tecidos e da corrente sanguínea (SANTOS et al., 2007).

Na sua superfície, existem as adesinas: são moléculas que fazem parte da estrutura gelatinosa que envolve a célula bacteriana e se ligam aos receptores químicos encontrados na superfície das células epiteliais do hospedeiro. Elas se ligam à IgG e fibrinogênio do sangue, à fibronectina e ao colágeno da matriz extracelular do hospedeiro para adesão, invasão e evasão (SANTOS et al., 2007).

Produzem enzimas, que criam um meio propício à sua colonização. Há duas coagulases: uma ligada à célula ou "*clumping factor*" que possuem receptores que se ligam ao fibrinogênio, e outra extracelular ou coagulase livre, que coagula o plasma por ativação da protrombina e depois transforma fibrinogênio em fibrina. As bactérias presentes no interior do coágulo ficam assim protegidas contra as defesas do hospedeiro (SANTOS et al., 2007). A produção de coagulase é o critério mais aceito e utilizado para identificação de estafilococos patogênicos associados à infecções agudas HERMANS et al., 2010). A catalase, que decompõe os radicais livres por oxirredução (dismutação) do peróxido de hidrogênio formados pelo sistema mieloperoxidase dentro dos fagócitos do hospedeiro, convertendo-os em $\frac{1}{2}$ molécula de oxigênio e água (SANTOS et al., 2007). Deste modo o peróxido de hidrogênio formado pelo macrófago não consegue eliminar as bactérias dentro de seu citoplasma. A hialuronidase, que degrada a matriz intercelular de mucopolissacarídeos do tecido conjuntivo do hospedeiro por hidrólise do ácido hialurônico, permitindo a bactéria se disseminar por áreas próximas (MARTINS, 1999). A fibrinolisa, que estimula a transformação do plasminogênio em plasmina, capaz de dissolver coágulos de fibrina.

Há também a produção de outras enzimas com diversos mecanismos de ação, tais como: proteases, lipases e termonuclease (DNase) (SANTOS et al., 2007; MARTINS, 1999). As proteases exfoliativas (hidrolisam a proteína da derme), as leucocidinas (tóxicas para polimorfonucleares, monócitos e macrófagos), que exercem uma forte atividade lítica sobre os granulócitos

(MARTINS, 1999). A hemolisina α lisa hemácias, tem ação necrosante em pequenos vasos e podem causar danos a plaquetas. (MARTINS, 1999). É tóxica para uma ampla gama de células de mamíferos, em particular eritrócitos, células epiteliais e serve principalmente como uma ferramenta que converte o tecido do hospedeiro em nutrientes para todas as bactérias que a expressam (DONG J., et al., 2013). É uma toxina de 33.2kDa (DONG J. et al., 2013). A hemolisina β ou betalissina, uma esfingomielinase C cujo funcionamento depende de magnésio (SANTOS et al., 2007), também é responsável pela hemólise das hemácias, sendo mais ativa sobre as de carneiro, cujas membranas são ricas em esfingomielina. Essa toxina também afeta outras células, como leucócitos e plaquetas (DZIEWANOWSKA et al., 1996).

Praticamente 15 a 20% das linhagens de *S. (pseud)intermedius* possuem uma proteína de superfície semelhante ou idêntica à proteína A do *S. aureus*, ancorada à parede celular, que podem se ligar ao fragmento Fc (fração cristalizável) da IgG (imunoglobulina G), impedindo a sua opsonização (GEORGIEVA, 2012). Apesar disso, o *S. pseudintermedius* é negativo para o teste rápido de fator de aglutinação e pelos testes comerciais de látex que detectam proteína A do *S. aureus*. Como consequência, há um risco grande de se identificar erroneamente essa bactéria como coagulase negativa nos testes de diferenciação (SLETTEMEAS et al., 2010). Segundo Bannoehr e colaboradores (2012), foram identificadas 18 proteínas de superfície representando possíveis fatores de virulência dessa espécie (cepa ED99). Foram nomeadas proteínas de superfície A-R (SpsA-SpsR). Esse estudo testou 3 supostas proteínas de adesão (D, L e O). As 3 foram expressas na superfície de uma bactéria não patogênica *Lactococcus lactis*, que não adere à corneócitos caninos. Duas dessas proteínas (D e O), mediaram aderência dessa bactéria aos queratinócitos caninos, sugerindo que elas contribuem com a patogênese e podem representar novos alvos terapêuticos para combater a infecção. Um estudo anterior demonstrou que o gene SpsO se apresentou em 30% dos isolados do *S. pseudintermedius* investigados, sugerindo que este promove uma vantagem de colonização em relação a outras cepas.

O muco é uma matriz de exopolissacarídeo que agrupa as bactérias em microcolônias, conferindo maior adesão (ARCIOLA et al., 2001). Essa capacidade de se organizar em biofilmes sugere uma vantagem evolutiva

dessas bactérias em relação às que não o conseguem fazer (GEORGIEVA, 2012).

As enterotoxinas do *S. (pseud)intermedius*, como outras enterotoxinas estafilocócicas, possuem uma atividade de superantígeno, ou seja, provocam a ativação de numerosos clones de linfócitos T. Essas enterotoxinas ativam os linfócitos T que expressam as moléculas V β , reconhecidos superantígenos, conduzindo a liberação maciça de citocinas, principalmente IL-2 e gama IFN, causando sintomas como indisposição, vômitos, diarréias, estado de choque (FITZGERALD, 2009).

1.2 TRATAMENTO DA PIODERMITE

O tratamento se inicia com antibióticos, evitando-se utilizar os mesmos aos quais a bactéria é resistente. É importante fazer raspado de pele, cultura e antibiograma antes de iniciar esse tratamento. Alguns antibióticos de última geração devem ser reservados a doenças mais sérias, quando não houver outra opção. Sempre deve se pensar nos efeitos colaterais de cada medicamento e sensibilidade de cada raça canina.

A resposta ao antibiótico é um indício forte para avaliação. O animal deve ser tratado por três a quatro semanas e então observada a sintomatologia. Se o prurido continuar, podem ser investigadas as doenças alérgicas, idiopáticas, seborréias primárias, avaliação do funcionamento da tireóide, realizando-se exames de sangue, urina e biópsia (DEBOER, 2006).

O tratamento torna-se difícil também devido aos fatores de virulência da bactéria, que conseguem evitar sua eliminação e promovem sua disseminação pelos tecidos do hospedeiro. Esses fatores são peças importantes no estabelecimento e manutenção das infecções e torna difícil a produção de uma vacina amplamente efetiva utilizada por via subcutânea até o momento (HU et al., 2005).

A vacinação pode ser uma boa opção em longo prazo para reduzir o risco de desenvolvimento de resistência a antibióticos, podendo destruir a bactéria, prevenir a colonização, diminuindo a seguir a resposta imunológica e assim mantendo o prurido sob controle.

1.2.1 ANTIBIOTICOTERAPIA E RESISTÊNCIA BACTERIANA

Opções para tratamentos longos podem incluir o uso de antimicrobianos tópicos, bacterinas estafilocócicas ou tratamentos intermitentes com antibióticos sistêmicos (DEBOER, 2006). O tratamento é dificultado pelo limitado número de antimicrobianos eficazes disponíveis (KIM et al., 2005).

Staphylococcus resistentes a meticilina foram isolados de animais domésticos desde 1970 e hoje em dia é comumente demonstrado em culturas. O uso indiscriminado de antibióticos em pacientes com cepas resistentes à meticilina aumenta o risco de desenvolver resistência a outras categorias de antimicrobianos (MORRIS et al., 2006). Por isso, nos últimos anos, segundo Waisglass (2009), aumentou a incidência de resistência bacteriana a diversos antibióticos tanto em humanos como em animais.

A emergente resistência a essas drogas, particularmente à meticilina, aumenta consideravelmente a falha do tratamento e representa risco à saúde pública (RUBIN et al., 2011).

Em um estudo realizado no Western College of Veterinary Medicine, não foi observada resistência aos aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprim/sulfametoxazol, rifampina, enrofloxacin, amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sul-bactam, ou cefalotina em *S. aureus* isolados a partir de qualquer espécie animal (RUBIN et al., 2011), sendo a maioria das cepas também sensível a cefalexina, gentamicina e oxacilina. Frequentemente se observa resistência à penicilina, tetraciclina, eritromicina, ampicilina e lincomicina (HAUSCHILD; WOJCIK, 2007). A cefovecina é uma cefalosporina de terceira geração utilizada com alta taxa de sucesso em foliculite bacteriana, feridas, abscessos causados por cepas de *Staphylococcus (pseud)intermedius*, *Streptococcus canis* e *Escherichia coli* em cães (WAISGLASS et al, 2009).

1.2.2 VACINAS PARA PIODERMITE

Há estudos sobre o uso de uma variedade de preparações estafilocócicas, utilizando *Staphylococcus aureus* vivas, lisadas ou inativadas em formalina empregadas em estudo clínico em seres humanos e em animais. O mecanismo de proteção contra essas infecções não foi entendida totalmente (HU et al., 2006).

Estudos anteriores sobre uso de bacterinas incluem o uso das autógenas (CURTIS et al., 2006), Staphoid AB® com bacterinas-toxóides (PUKAY, 1985), *Staphylococcus aureus* lisado por um bacteriófago, Staphage Lysate SPL® (Delmont Laboratories, USA), Lysigin® (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., St. Joseph, USA) (DEBOER, 1990), bacterina do *Propionibacterium acnes*, Immunoregulin® (ImmunoVet Inc, USA) (BECKER, 1989), além da Estafilin® (LARSSON, 2008).

Pukay (1985) administrou sua vacina Staphoid AB® por 5 dias consecutivos e continuou com injeções semanais por 3 semanas, sendo que 56,25% dos casos recidivaram, sugerindo que a duração do tratamento deveria ter sido estendida. É necessário decidir quantas injeções de reforço seriam necessárias para remissão completa do quadro. Este estudo sugere que injeções diárias por 5 dias, injeções semanais por 3 semanas e injeções mensais por 3 meses poderiam ser satisfatórias para controlar a piodermite canina (BORKU et al., 2007).

Uma das preparações efetivas foi o SPL®, juntamente com antibiótico à base de oxacilina e shampoo de peróxido de benzoíla, com taxa de sucesso em 77%. Porém, a antibioticoterapia utilizada torna impossível determinar o quanto a vacina foi eficaz. A literatura sugere que uma vacina de bacterina possa ser a primeira escolha (sem uso de antibióticos) para resolver uma possível desordem primária, restaurando ou ativando o sistema imunológico (BORKU et al., 2007).

Lysigin® é uma cultura lisada com antígenos somáticos polivalentes contendo fagos dos tipos I, II, III e IV e miscelâneas de *Staphylococcus aureus*. Foram utilizadas em mastites de vacas e testadas em piodermites de cães. Nesse estudo, ela é utilizada como tratamento único e sua taxa de sucesso é de 90,48% (BORKU et al., 2007).

A Estafilin® é uma bacterina composta por cepas de *S.aureus* e *S.intermedius*, utilizada com antibioticoterapia, que apresentou resultados de remissão plena ou moderada da ordem de 57,2%, sendo que em muitos casos em que houve remissão da piodermite não foi necessário utilizar antibióticos por um longo período de tempo (LARSSON JR., 2008).

A vacina feita com bacterina autógena é uma das mais eficazes, embora seja muito difícil preparar uma vacina para cada indivíduo com piodermite (DEBOER, 1990).

Segundo Scott (2000), os casos de piodermite profunda muitas vezes precisam de tratamento adjunto para ser controlado. Em seu estudo, quatro meses de administração de bacterinas com uma agenda programada foram suficientes para controlar tanto a piodermite profunda como a superficial (BORKU et al., 2007).

Curtis e colaboradores (2006), conduziram um estudo utilizando bacterina autógena junto com antibióticos sistêmicos para tratar piodermite idiopática canina e concluíram que foi mais eficaz do que apenas a antibioticoterapia.

1.3 A PELE DOS MAMÍFEROS

A arquitetura básica da epiderme dos mamíferos é semelhante, mas existem algumas diferenças entre as espécies animais, dentro da mesma espécie e nas regiões do corpo do mesmo indivíduo (MONTAGNA, 1967; MEYER et al., 1978). Na pele de mamíferos com pelos, a epiderme é muito mais fina do que a de humanos (AFFOLTER; MOORE, 1994). Em geral, a epiderme do cão possui duas a três camadas de células nucleadas (WEBB; CALHOUN, 1954; LLOYD; GARTHWAITE, 1982), mas pode atingir até 10 camadas dessas células em determinados locais (SCOTT et al. 2001). Independentemente do número de camadas, não há cristas da rede (cristas interpapilares ou *rete ridges*) na pele com pêlos de cães e gatos (YAGER; WILCOCK, 1994).

A epiderme, a camada mais externa da pele (Figura 2), é constituída por um epitélio estratificado, pavimentoso e queratinizado, e subdividida em estrato basal (estrato germinativo), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (estrato disjunto) (WEBB; CALHOUN, 1954). A espessura, o tipo de camada córnea e a presença ou ausência do estrato lúcido são influenciados pela densidade da pelagem (MONTAGNA, 1967). A epiderme é constituída por quatro tipos celulares: aproximadamente 85% de queratinócitos, 5%-8% de melanócitos, 5% de células de Langerhans e células de Merkel (BACHA & WOOD, 1990; BANKS, 1992; MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993;

YAGER & SCOTT, 1993). Os queratinócitos migram constantemente para formar os diferentes estratos epidérmicos (BANKS, 1992; MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993) de modo que o estrato basal é o berço das células da epiderme e a queratina é o produto da diferenciação dos queratinócitos basais (SCOTT et al., 2001). Assim, a epiderme é uma estrutura dinâmica constantemente renovada pela descamação do estrato córneo (KRISTENSEN, 1975).

Figura 2 Pele com pelos (cão). A epiderme é delgada e levemente ondulada. HE, obj. 4x. Yager; Wilcock, 1994.

A membrana basal é responsável pela separação dermo-epidérmica e fixa a epiderme na derme, mantendo a arquitetura da pele. A ultra-estrutura da membrana basal pode ser dividida em quatro componentes básicos: membrana plasmática da célula basal (com hemidesmossomas e filamentos de ancoragem), lâmina lúcida ou lâmina rara (composta de laminina), lâmina densa ou lâmina basal (composta de colágeno tipo IV) e área da sublâmina densa ou lâmina fibroreticular (composta de fibrilas de ancoragem e microfibrilas) (URMACHER, 1997).

A derme ou córion tem origem mesodérmica e está separada da epiderme pela membrana basal (BANKS, 1992; BRAGULLA et al., 2004). A derme humana é dividida em derme papilar (ou superficial) e derme reticular (ou profunda). A derme papilar se interdigitaliza com a epiderme através das papilas dérmicas e epidérmicas (KÜHNEL, 2005; KIERSZENBAUM, 2006). A

derme reticular localiza-se entre a derme papilar e o tecido subcutâneo (MCKEE, 1999).

Alguns autores dividem a derme dos animais da mesma forma como é feito para derme humana (GRAU & WALTER, 1975; BACHA & WOOD, 1990; MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993), mas como na pele de cães não há cristas da rede e papilas dérmicas, a derme desses animais deve ser dividida em superficial e profunda (AFFOLTER; MOORE, 1994; SCOTT et al., 2001).

A derme é formada por tecido conjuntivo, principalmente na forma de fibras entrelaçadas, pelos elementos celulares, folículos pilosos e glândulas anexas (BANKS, 1992; BRAGULLA et al., 2004; HARGIS; GINN, 2007). Nela estão localizados vasos sangüíneos, vasos linfáticos, nervos e músculo liso (músculo eretor do pêlo) (BANKS, 1992; SCOTT et al., 2001; BRAGULLA et al., 2004; HARGIS; GINN, 2007).

As células predominantes na derme são os fibroblastos, os macrófagos e os mastócitos (KRISTENSEN, 1975; HEADINGTON & CERIO, 1990; SCOTT 1980). Outras células menos presentes incluem linfócitos e plasmócitos, que, junto com as células de Langerhans, formam o tecido linfóide associado à pele (HARGIS; GINN, 2007). Em algumas regiões do corpo, a derme profunda da pele com pêlos possui variável quantidade de adipócitos (MONTEIRO-RIVIERE et al., 1993).

Figura 3. A barreira física e imunológica da pele. A epiderme é composta por camadas de queratinócitos (córnea, granular, espinhosa e basal). Existem glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículos pilosos que se estendem por estas camadas. Além disso, existem muitas células imunes residentes na pele que participam das respostas imunes. Na epiderme, existem as células de Langerhans e na epiderme dos camundongos, há DETCs. Na derme, existem mastócitos, macrófagos, células dendríticas mielóides e plasmocitóides, Células B e T, células NK, e as células do plasma. Neutrófilos, monócitos e outras células recrutadas da circulação também participam das respostas imunológicas cutâneas. (KRISHNA S, MILLER LS, 2012).

1.4 CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DA PELE

É essencial compreender as respostas imunológicas cutâneas contra o *S. aureus*, como essas infecções ocorrem, sua origem e como colonizam a pele e mucosa. Isso inclui a resposta imune inata, peptídeos com atividade antimicrobiana direta contra *S. aureus*, bem como receptores de reconhecimento de padrões (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) e de citocinas pró-inflamatórias que promovem a formação de abscessos por neutrófilos na pele. Igualmente importantes são as recentes descobertas envolvendo as respostas mediadas por IL-17, que são elo fundamental entre as respostas inata e adaptativa pele (SCHMITT, 1997).

Alguns tipos de células, conhecidas como mediadoras da inflamação e citocinas estão envolvidas na regulação dos processos inflamatório e imunológico da pele (SCHMITT, 1997).

As células da pele com funções imunorreguladoras e pró-inflamatórias incluem os queratinócitos, melanócitos, células Merkel e as dendríticas epiteliais (MATHERS; LARREGINA, 2006).

Os queratinócitos epidérmicos têm múltiplos mecanismos para promover respostas imunes cutâneas inatas iniciais contra *S. aureus*. Em primeiro lugar, os queratinócitos produzem peptídeos antimicrobianos que possuem atividade bacteriostática direta ou bactericida contra *S. aureus*, incluindo a β defensina-2 (hBD2), hBD3, catelicidinas (LL-37), e RNase 7 (KRISHNA; MILLER, 2012; SIMANSKI et al., 2010).

Em segundo lugar, os queratinócitos expressam PRRs (padrões de reconhecimento de receptores) como Toll-like receptores (TLR), incluindo TLRs 1, 2, e 6, os quais reconhecem lipopeptídeos de *S. aureus*, ácido lipoteicóico e peptidoglicano, e NOD2, que reconhece muramildipeptídeo (um produto da decomposição do peptidoglicano do *S. aureus*) (MILLER, 2008). Estes PRRs promovem respostas imunes inatas, tais como a produção de peptídeos antimicrobianos, citocinas e quimiocinas que promovem o recrutamento de neutrófilos, os quais contribuem para a defesa inicial contra *S. aureus* (MILLER; CHO, 2011).

Finalmente, os queratinócitos podem ser ativados por bactérias comensais da pele tais como o *S. epidermitis*, que ativa TLR2, conduzindo ao aumento da produção de peptídeos antimicrobianos (por exemplo, hBD2, hBD3, e RNase 7), que por sua vez promovem a morte de *S. aureus*. Tomados em conjunto, queratinócitos não só fornecem uma barreira física para impedir infecção por *S. aureus*, mas também promovem respostas imunes iniciais através da produção de peptídeos antimicrobianos, ativação de PRRS e produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que promovem o recrutamento de neutrófilos e outras células do sistema imunológico para a pele (LAI et al., 2010; WANKE et al., 2011).

Os primeiros alvos dos alérgenos de contato são os queratinócitos, mas a célula mais importante é a de Langerhans (CL). A CL é uma célula dendrítica da epiderme, que transmite a informação imunológica para uma boa

antigenicidade e induz uma resposta de proliferação de linfócitos específica: a primeira sensibilização (SCHMITT, 1997). Essa sinalização inata precede e é essencial à geração de células B e T (Souza, 2004).

As doenças inflamatórias da pele dependem das células T. O infiltrado celular composto principalmente por células T se inicia e se mantém pelas células apresentadoras de antígeno. Como regra, as células T precisam de estimulação para se tornarem células efectoras. As APC (apresentadoras) ou células do sistema imune da derme são grupos heterogêneos de células que incluem macrófagos, células B e células dendríticas dermais. Estas duas últimas são encontradas em pequena porcentagem em vários órgãos do corpo e são divididas em mielóides e linfóides. São as apresentadoras mais eficientes e capazes de iniciar uma resposta primária e secundária (WOLLENBERG, 2006).

Após a primeira sensibilização, as células que correspondem às células T de memória retornam à circulação. O passo da indução secundária é quando a pele tem novo contato com o mesmo antígeno. As CL repetem o processo anterior. As células T de memória circulantes e as presentes na derme são então reestimuladas e sua ativação induz a produção de citocinas, responsáveis pela reação inflamatória característica da resposta imune, na qual os macrófagos, linfócitos e células polimorfonucleares estão envolvidos (SCHMITT, 1997).

Finalmente, os caminhos podem ser uma reação inflamatória ou tolerância, como por exemplo, a anergia linfocitária clonal, ainda pouco elucidada. Algumas hipóteses envolvem citocinas, subpopulações de linfócitos, e uma possível função de apresentação de antígenos dos queratinócitos para explicar essa situação de não-resposta ou restauração da normalidade (SCHMITT, 1997).

1.5. VACINAS INTRADÉRMICAS

Os mecanismos básicos da imunidade inata e adaptativa estão sendo compreendidos com os progressos na administração de vacinas em humanos. A pele foi vista como ótimo local para vacinação devido à presença de uma rede de células apresentadoras de antígenos (STICCHI et al., 2010).

A derme é rica em sistemas microvasculares que permitem a interação entre as células do sistema imune ativadas e os linfonodos regionais (STICCHI et al., 2010). Células do sistema inato e adaptativo residem e circulam através da derme, como os macrófagos, mastócitos, células dendríticas e de Langerhans. As células apresentadoras de antígenos são peças essenciais em processar os antígenos, resultando na ativação do sistema imunológico, amplificando a resposta imune adaptativa (Figura 4) (NICOLAS; GUY, 2008; KIM, 2011). Por essa razão, é possível que a vacinação intradérmica possa resultar em respostas imunes superiores quando comparada a outras vias de inoculação (LAMBERT; LAURENT, 2008).

Figura 4 Mecanismos e células envolvidas na resposta imune inata e adaptativa após administração de antígeno vacinal utilizando as rotas intradérmica e intramuscular. Adaptado de Nicolas, JF et al., 2008

Enquanto a resposta imune adaptativa é primordial para gerar uma resposta à vacinação e se torna mais efetiva cada vez que encontra o mesmo antígeno, os mecanismos de resposta inata também tem um papel importante como os primeiros a serem ativados em resposta à invasão por um patógeno ou contato com antígenos estranhos (STICCHI et al., 2010).

Estudos demonstram que para algumas vacinas, em seres humanos, como raiva e gripe, com doses reduzidas por via intradérmica resultam em respostas imunes equivalentes à dose padrão administrada por via convencional. Para hepatite B é mais variável, mas ainda encorajador (SANGARÉ, 2009), bem como poliovírus inativado, febre amarela e hepatite A (HIKCLING et al., 2011).

Ainda são necessários muitos testes com vacinas de polissacarídeos conjugados, como meningite-pneumonia, e vacinas que contenham adjuvantes como alumínio ou óleo-em-água devido à reação local indesejável que poderiam causar (HIKCLING et al., 2011).

Pesquisas estão sendo desenvolvidas também com animais nos Estados Unidos. Em 1999, foi testada uma vacina de DNA para raiva em cães e gatos, utilizando-se as vias intramuscular, intradérmica por inoculação ou escarificação. Foram inoculados 100ug em cada animal nos dias 0 e 55, menos um grupo de gatos que foi imunizado com 300µg intramuscularmente para comparação. Como resultados, em termos de magnitude da resposta, a rota intramuscular se mostrou melhor que as outras nos cães, após 77 dias da inoculação, sendo que por escarificação, não foram detectados anticorpos nessa data. Em se tratando de porcentagem de soroconversão, a rota intramuscular e a intradérmica foram satisfatórias, sendo que por escarificação apresentou apenas 50% em relação às anteriores. Nos gatos, com a dose de 100µg, as vias intradérmicas foram superiores à intramuscular. Entre os dias 55 e 259, os títulos das vacinações intramusculares declinaram, enquanto que os das intradérmicas aumentaram, mantendo-se em níveis satisfatórios de proteção contra a doença. Nos animais que receberam 300 µg da vacina intramuscularmente, as respostas foram significativamente mais altas, sugerindo mais estudos podendo-se ajustar a dose (OSÓRIO et al., 1999).

Em 2003, foi realizado um estudo com cães para determinação do melhor método para se conseguir alcançar altos níveis de anticorpos com vacina de DNA para raiva, que perdurassem por um longo período de tempo com apenas uma vacinação. Foram inoculados 10 µg divididos em 5 injeções de 2 µg cada por via intradérmica na região do pavilhão auricular, 100 µg em cada lado do pescoço também por via intradérmica, 100 µg em cada pavilhão

auricular pela mesma via anterior e 100 µg por via intramuscular em cada músculo quadríceps femoral. Foram colhidas amostras de sangue antes e em 10, 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a vacinação. Após esta última colheita, todos os cães foram re-imunizados no pavilhão auricular por via intradérmica. Como resultado, os títulos de anticorpos aos 150 dias foram mais altos no grupo que receberam inoculação de 100 µg intradermicamente em cada pavilhão auricular, seguido pelo grupo que recebeu a vacina na região do pescoço, a seguir o grupo da vacinação por via intramuscular e por último o grupo que recebeu a dose fracionada intradermicamente no pavilhão auricular. Vinte dias após a segunda imunização, os níveis de anticorpos aumentaram significativamente, mantendo a mesma ordem anterior (LODMELL et al., 2003).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A piodermite canina é uma doença que pode atacar cães de todas as idades, podendo se iniciar a partir de qualquer falha no sistema imunológico do animal. O *Staphylococcus (pseud)intermedius* é encontrado na pele de todos os cães, e por isso se torna um patógeno oportunista, sendo muito difícil controlá-lo quando se inicia a infecção.

A morbidade é grande, embora a taxa de mortalidade possa não ser tão significativa, principalmente entre os animais que apresentam piodermite superficial.

Os animais de companhia transmitem a bactéria a seres humanos. Um ambiente contaminado dividido por humanos e animais resulta em contaminação cruzada com estafilococos. Casos de mãe e filha apresentando infecção foi associada ao mesmo micro-organismo isolado do cão e do gato da mesma casa. A frequência de transmissão parece ser pequena, embora possa haver casos não investigados ou não reportados (DUQUETTE; NUTTALL, 2004).

Há uma falta de colaboração por parte dos proprietários, que muitas vezes tendem a se livrar do animal a tratá-lo, devido às dificuldades para administrar medicamentos por via oral por um longo tempo, o cheiro ruim da pele desses animais acometidos e por fim a recorrência do problema poucas semanas após o término do tratamento com antibióticos.

A criação de uma vacina preventiva intradérmica aplicada nos primeiros meses de vida do animal e reaplicada anualmente poderia evitar o início dessas infecções e protegeria o animal durante sua vida, mantendo o sistema imunológico sistêmico e da sua pele sempre ativo contra esses micro-organismos. Ela poderia ser produzida a partir de bacterinas e exoproteínas do *S. aureus* e *S. intermedius* ou apenas a partir de uma ou mais frações antigênicas.

A via intradérmica é de suma importância, pois a vacina estaria sendo entregue diretamente onde estão as células dendríticas da epiderme, induzindo assim a primeira sensibilização e produzindo os linfócitos T de memória, que serão reativados prontamente se o animal tiver novo contato com o patógeno. A dose administrada poderia ser menor ou igual do que por via subcutânea ou intramuscular, promovendo a mesma resposta imune ou superior.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Objetivos principais:

- ✓ Desenvolvimento de uma formulação antigênica segura e eficaz que possa ser administrada nos primeiros meses de vida do animal e repetida anualmente.
- ✓ Estudar a melhor via de administração, intraperitoneal ou intradérmica do antígeno vacinal estafilocócico.

Objetivos secundários:

- ✓ Demonstrar que a composição antigênica pode provocar uma reação imunológica local e sistêmica ao principal agente etiológico da piodermite.
- ✓ Verificar a neutralização das principais enzimas relacionadas a patogenicidade do *Staphylococcus spp.*
- ✓ Desenvolver método “in vitro” baseado na reação antígeno-anticorpo para determinação da potência da vacina.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS*:

4.1.1 BANCO DE CÉLULAS

A bactéria utilizada foi *Staphylococcus intermedius*, ATCC 29663. O meio de cultura utilizado foi o *Caldo de Caseína de Soja Tripsinizado* - TSB (BD). Foram adicionados 100 UFC (Unidade Formadora de Colônia) de bactéria a 100ml de TSB em um erlenmeyer de 300ml, posteriormente incubado por 24 horas em shaker a 37°C e 150rpm. Após o tempo de incubação, a cultura foi distribuída em 50 criotubos de 2ml, estéreis, e armazenados a -80°C.

4.1.2 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A taxa é importante para determinação do processo, bem como ao apresentar qualquer alteração na curva de crescimento poderá indicar contaminação ou modificação genética do organismo.

Foram adicionados 100 UFC (unidade formadora de colônia) em 100mL de TSB. A cultura foi incubada em shaker a 37 °C/150 rpm. A curva de crescimento foi obtida através da mensuração da densidade ótica desta cultura (triplicata) a cada 1 hora em espectrofotômetro a 590nm, até que chegasse à sua fase estacionária, evidenciada por quatro leituras de valores similares.

Através da curva de crescimento foram calculadas a taxa de crescimento e a taxa máxima de crescimento.

Cálculo dos parâmetros cinéticos:

O estudo cinético de um bioprocesso consiste inicialmente na análise de evolução dos valores das concentrações do substrato, células e produto em função do tempo de cultivo, para isso foram utilizadas as seguintes equações:

$$rX = dX/dt$$

$$\mu X = rX/X$$

$$\mu_{\max} = \text{coeficiente angular da reta } \ln X \text{ versus tempo}$$

$$td = \ln 2 / \mu_{\max}$$

$$rS = dS/dt$$

$$\mu S = rS/X$$

$$Y_{x/s} = X_o - X_f / S_o - S_f$$

$$P_p = P_f - P_o / t_f$$

Velocidade instantânea de crescimento ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Velocidade específica de crescimento (h^{-1})

Velocidade máxima de crescimento (h^{-1})

Tempo de duplicação (h)

Velocidade instantânea de consumo do substrato ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Velocidade específica de consumo do substrato (h^{-1})

Conversão de substrato em células (g.g^{-1})

Produtividade volumétrica do produto ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

em que: rX = velocidade de crescimento celular
 X = concentração de células
 t = tempo
 μX = velocidade específica de crescimento
 μ_{max} = velocidade máxima de crescimento na fase exponencial
 t_d = tempo de duplicação
 rS = velocidade de consumo de substrato
 S = concentração de substrato
 μS = velocidade específica de consumo de substrato
 PP = Produtividade do produto
 P_f = Concentração final de produto
 P_o = Concentração inicial produto
 t_f = tempo final de cultivo

4.1.3. PRODUÇÃO DE EXTRATO BACTERIANO

Após o crescimento as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação em centrífuga Sorvall RC 6 Plus, a 3.000 rpm/30 min/4 °C. As células foram lavadas 3 vezes com solução de PBS (Tampão Fosfato) e centrifugadas nas mesmas condições anteriores.

Por fim as células foram suspensas em uma solução de PBS-Formaldeído 3,0 %, mantidas em estufa a 37 °C por 30 dias, para inativação.

4.1.4 RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE POR ULTRAFILTRAÇÃO

Os métodos de filtração que utilizam membranas de fluxo tangencial separam os materiais dissolvidos ou em suspensão, de acordo com sua massa molecular e a sua dimensão.

O sobrenadante bacteriano foi filtrado em membrana de 0,22 micra e depois concentrado e diafiltrado por filtração tangencial com filtro WaterSep® com cut off de 5 kDa.

A membrana atua como filtro, criando um gradiente de diferencial de pressão, ou seja, para que haja o transporte de material através de uma membrana, é necessário que haja uma força motriz agindo sobre este. As grandes moléculas suspensas em solução são retidas, enquanto que a água, de menor tamanho molecular, passa pelo poro da membrana pelo diferencial de pressão, também chamado de pressão trans-membrana (TMP). Esta tecnologia permite a separação de partículas fluídicas com dimensões e massa molecular menor que a de corte da membrana.

Foram concentrados 100 ml do sobrenadante a 10 ml, sendo mantidos em tampão PBS, aliquotado e congelado a -80 °C.

4.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL PELO MÉTODO DE BRADFORD

Foram determinadas as proteínas do sobrenadante e do lisado bacteriano.

Esse método quantifica as proteínas fazendo a interação entre o corante e macromoléculas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas.

A solução foi preparada e realizadas diluições seriadas frente a um padrão de proteína, neste caso a Soro Albumina Bovina (BSA).

Incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos e foi feita a contagem das proteínas em espectrofotômetro em 595nm.

4.3 CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DO LISADO BACTERIANO E DO SOBRENADANTE (ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA)

Dez microgramas de proteína de amostras sobrenadante ativo e inativo e de células ativas e inativadas foram suspensas no tampão de solubilização

de amostra (v/v) contendo 2,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 22,5 % de 2-mercaptoetanol, 10 % de glicerol, tampão tris-HCL 0,5M, pH 6.8 e azul de bromofenol. A suspensão foi aquecida por 5 minutos em banho de água fervente. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14 % para amostras reduzidas com 2-mercaptoetanol em espaçamento de 1 mm de espessura, com sistema tampão descontínuo segundo Laemmli (1970) e Studier

Como resultado, uma mistura complexa de proteínas foi separada em uma série de diferentes frações de proteínas arranjadas de acordo com sua massa molecular. As proteínas maiores foram facilmente detectadas corando as proteínas do gel com o corante azul de Coomassie.

4.4 ANIMAIS UTILIZADOS

Na imunização, foram utilizados 48 camundongos BALB/c do sexo masculino, com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, aprovados pelo comitê de ética para experimentação em animal no dia 20 de fevereiro de 2013, protocolo CEUA/FCF/405.

4.5 TESTE DE ANTIGENICIDADE

Os antígenos estafilocócicos foram elaborados e a antigenicidade do *Staphylococcus intermedius* testada pela inoculação em camundongos por via intradérmica e intraperitoneal com 20 µL de solução contendo 5 µg de proteína.

Foram utilizados 8 grupos com 6 camundongos cada, descritos abaixo:

Grupo 1 – PBS (controle) via intradérmica (G1)

Grupo 2 – PBS via intraperitoneal (G2)

Grupo 3 – antígenos do sobrenadante inativado via intradérmica (G3)

Grupo 4 – antígenos do sobrenadante inativado via intraperitoneal (G4)

Grupo 5 – antígenos do precipitado inativado (G5)

Grupo 6 – antígenos do precipitado inativado (G6)

Grupo 7 – antígenos do sobrenadante e precipitado associados e inativados (G7)

Grupo 8 – antígenos do sobrenadante e precipitado associados e inativados (G8)

A reinoculação foi efetuada 15 dias após o estímulo primário. Após 7 dias foram coletadas 150 µl de amostras de sangue por punção da veia submandibular. O sangue foi centrifugado e o soro separado para ensaio imunoenzimático, utilizando o teste de ELISA indireto.

4.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DO *STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS*

Os títulos individuais de anticorpos contra o *Staphylococcus intermedius*, em camundongos, foram determinados pela técnica de reação imunoenzimática (ELISA) (HASHIDA et al., 1995). Microplacas de 96 cavidades (Corning® cat. n.º 3590, Acton, MA, EUA) foram sensibilizadas com extratos de bacterinas, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6 na concentração de 10 µg/mL. Em cada cavidade, foi colocado 100µL e incubado por 18 horas a 4 °C. Os sítios livres de cada poço foram bloqueados por duas horas à temperatura ambiente, com uma solução de BSA em tampão PBS, pH 7.4. Após a adição de 100 µl das diluições em série (razão 2) dos soros de camundongo e incubação a 37 °C por 2 horas, foi utilizado anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo, conjugado à peroxidase (Sigma®, cat. n.º A3673, St. Louis, MO, EUA). Como substrato, foi utilizado O-fenilenodiamina (Sigma®, cat. n.º P9187, St. Louis, MO, EUA) e peróxido de hidrogênio a 0,03 % (Synth®, São Paulo, Brasil). A reação foi interrompida aos 15 minutos da reação com o cromógeno, pela adição de ácido sulfúrico a 2,5 N, e a densidade óptica foi medida, usando-se um leitor de ELISA (Stat Fax® Awareness Technology) com filtro de 492nm. Os títulos foram obtidos através do processamento das densidades ópticas obtidas versus o logaritmo da diluição, de modo a se obter a dose efetiva 50% (DE50) (LEINIKKI; PASSILA, 1977).

O título foi determinado através da fórmula:

$$\frac{(\text{ABS da Amostra}_{(\text{id ou ip})} - \text{ABS do Branco})}{(\text{ABS do Cont Neg}_{(\text{id ou ip})} - \text{ABS do Branco})} \geq 0,100$$

id - amostras aplicadas por via intradérmica

ip – amostras aplicadas por via intraperitoneal

As estimativas da curva de titulação foram determinadas através do Software GraphPad Prism v.5.0 e a análise da curva bem como a determinação

do valor de X para absorbância em 492nm igual a 0.,100 através do software Mapple v. 13.0

Fórmula utilizada: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((X - \text{LogIC50}))})$

4.7 VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOPROTEÍNAS (ENSAIOS BIOLÓGICOS)

4.7.1 TESTE DE HEMÓLISE (HEMOLISINA)

Quinhentos microlitros de hemácias foram lavadas 3 vezes em 5ml de solução PBS acrescido de 25mM de Cloreto de Potássio;

Foram preparadas cinco concentrações diferentes de papa de hemácia (30, 20, 10, 5 e 2µl), utilizadas para determinar a concentração ótima de hemácia frente a concentração de hemolisina;

Após a determinação da concentração ótima de hemácia foi determinada a dose hemolítica 50% (DH50), para cada tipo de produto bacteriano: sobrenadante ativo, sobrenadante inativado, bacterina ativa e bacterina inativada. Somente o sobrenadante ativo e a bacterina ativa tiveram atividade hemolítica, porém o uso da bacterina ativa apresentava erro de leitura no espectrofotômetro em 450nm e por isto não foi utilizada.

Determinada a DH50 do sobrenadante ativo (1/12), foi usada uma dose 3 vezes maior como desafio no teste de inativação por anticorpos, igual a 1/4.

4.7.2 TESTE DE INIBIÇÃO DE HEMÓLISE POR ANTICORPO

Soros dos animais imunizados com diversas formulações de antígeno foram empregados para o teste de inibição da hemólise por anticorpo.

Em uma placa de 384 poços foram adicionados 10 µl de PBS com 25 mM de Cloreto de potássio em todos os poços onde o teste seria realizado.

Nas fileiras de diluição 1:2 foram adicionados 36 µl de “pool” de soro dos animais em triplicata e realizada diluição serial na razão 1:2 até a diluição 1:32 com 18 µl da diluição anterior, obtendo seis concentrações diferentes do soro de cada animal.

Foram adicionados 10 µl de sobrenadante ativo de cultura de *Staphylococcus intermedius*, ficando uma concentração final igual a 1/2 de hemolisina. A mistura hemolisina e soro foi incubada a 37 °C por 30 min.

Foram adicionados 20 µl de solução de hemácia, ficando uma concentração final de hemácia igual a 1/20 e obtendo diluições seriadas finais dos soros de 1:4 até 1:256.

As amostras foram incubadas por 2 horas a 37 °C, e depois centrifugadas em centrífuga Sorvall (Legend XTR) por 15 minutos a 1200 g.

Com uma micropipeta foram transferidos para outra placa 20 µl do sobrenadante e feita a leitura em espectrofotômetro em 540nm.

Os resultados foram expressos em títulos neutralizantes de 50% da dose desafio.

4.7.3 TESTE DA CATALASE (REDUÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO)

Mil microlitros de cada tipo de produto, sobrenadante ativo, sobrenadante inativo, bacterina ativa e bacterina inativa, foram misturadas com 30 µl de uma solução de peróxido de hidrogênio 30 V. Foi considerada positiva a amostra que produziu bolhas (liberação de oxigênio).

4.7.4 INIBIÇÃO DA CATALASE POR ANTICORPOS

Em função da quantidade de soro dos animais, os testes foram feitos em lâmina adicionando 10 µl de diluição seriada de pool de soro de animais, iniciando 1:2 até 1:16. Foram adicionados 0.3 µl de peróxido de hidrogênio 30 V. A amostra de sobrenadante ativo, sem soro foi considerado controle positivo e o meio de cultura caldo TSB foi considerado como controle negativo. Os resultados foram qualitativos demonstrando onde houve ou não inibição.

4.7.5 TESTE DA COAGULASE EM TUBO

O teste da coagulase baseia-se na presença da coagulase livre que reage com um fator plasmático formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina.

Adicionou-se 0,1 ml de caldo TSB, incubado 24 horas, com colônia-teste a um tubo de ensaio com 0,5 ml de plasma de coelho Coagu-Plasma® (Laborclin). Em seguida, incubou-se por 4 horas à 35 °C em estufa. A formação do coágulo foi observada pela inclinação suave do tubo de ensaio a 90 graus da vertical.

4.7.6. TESTE DE INIBIÇÃO DA COAGULASE POR ANTICORPO

Em função da quantidade de soro disponível o teste foi realizado em lâmina de vidro de 2,5 x 7,5 cm. Foi usado como controle positivo exoenzima derivada de *S. aureus* e como controle negativo PBS. 10 µl de amostras de cultivo ou CN ou CP foram adicionadas sobre a lâmina. Foram acrescidos mais 10 µl de PBS pH 7.4 e homogeneizado com cada amostra. 10 µl de um pool de plasma de coelho liofilizado contendo EDTA foi acrescida a mistura e colocado a 37 °C em câmara úmida por 2 horas. Foi considerado positivo as gotas de coágulo que não escorreram da lâmina ao inclinar mais de 45°. Todas as amostras de sobrenadante ativo e de bacterina ativa deram coagulase positiva e foram usadas para o teste de inibição da coagulase.

Em uma lâmina foram adicionados 10 µl de CP, CN e amostra de sobrenadante ativo ou bacterina ativa sobre a lâmina. Depois foram acrescentados 10 µl de soro de camundongo com diferentes formulações, com exceção o CP e o CN. As misturas soro e amostras foram mantidas em câmara úmida a 37 °C por 30 minutos e depois mais 10 µl de de um pool de plasma de coelho liofilizado contendo EDTA foi acrescida à mistura e colocado a 37 °C em câmara úmida por 2 horas. Foi considerado positivo as gotas de coágulo que escorreram da lâmina ao inclinar mais de 45°.

4.8 CITOTOXICIDADE POR MTT

Os ensaios de avaliação da citotoxicidade permitem averiguar os efeitos tóxicos ou anti-proliferativos da amostra-teste em culturas celulares.

Foram preparadas três placas de 96 cavidades (Corning®, cat. n°. 3628, Acton, MA, EUA) com células L929 24 horas antes do início do teste, sendo que 100µl de $5,0 \times 10^5$ células/mL foram colocadas em cada cavidade, com exceção da primeira coluna da placa para leitura do branco. As placas foram incubadas em estufa a 36,5°C com 5% de CO₂.

Em outras três placas de 96 cavidades, limpas, foram feitas diluições seriadas e em triplicata das amostras inativadas e não inativadas em meio de Eagle na ausência de soro fetal bovino, conforme QUADROS 2, 3 e 4.

QUADRO 2 - ESQUEMA DE DILUIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE *S. INTERMEDIUS* EM PLACAS DE 96 CAVIDADES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco	SobINA 1:2	SobINA 1:2	SobINA 1:2	SobAT 1:2	SobAT 1:2	SobAT 1:2	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
B	Branco	SobINA 1:4	SobINA 1:4	SobINA 1:4	SobAT 1:4	SobAT 1:4	SobAT 1:4	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
C	Branco	SobINA 1:8	SobINA 1:8	SobINA 1:8	SobAT 1:8	SobAT 1:8	SobAT 1:8	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
D	Branco	SobINA 1:16	SobINA 1:16	SobINA 1:16	SobAT 1:16	SobAT 1:16	SobAT 1:16	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
E	Branco	SobINA 1:32	SobINA 1:32	SobINA 1:32	SobAT 1:32	SobAT 1:32	SobAT 1:32	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
F	Branco	SobINA 1:64	SobINA 1:64	SobINA 1:64	SobAT 1:64	SobAT 1:64	SobAT 1:64	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
G	Branco	SobINA 1:128	SobINA 1:128	SobINA 1:128	SobAT 1:128	SobAT 1:128	SobAT 1:128	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
H	Branco	SobINA 1:256	SobINA 1:256	SobINA 1:256	SobAT 1:256	SobAT 1:256	SobAT 1:256	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco

SobINA = sobrenadante de cultura de *S. intermedius* **inativada** por formaldeído

SobAT = sobrenadante de cultura de *S. intermedius* **ativa**.

QUADRO 3 - ESQUEMA DE DILUIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE *S. INTERMEDIUS* EM PLACAS DE 96 CAVIDADES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco	CBInat 1:2	CBInat 1:2	CBInat 1:2	CBAtv 1:2	CBAtv 1:2	CBAtv 1:2	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
B	Branco	CBInat 1:4	CBInat 1:4	CBInat 1:4	CBAtv 1:4	CBAtv 1:4	CBAtv 1:4	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
C	Branco	CBInat 1:8	CBInat 1:8	CBInat 1:8	CBAtv 1:8	CBAtv 1:8	CBAtv 1:8	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
D	Branco	CBInat 1:16	CBInat 1:16	CBInat 1:16	CBAtv 1:16	CBAtv 1:16	CBAtv 1:16	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
E	Branco	CBInat 1:32	CBInat 1:32	CBInat 1:32	CBAtv 1:32	CBAtv 1:32	CBAtv 1:32	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
F	Branco	CBInat 1:64	CBInat 1:64	CBInat 1:64	CBAtv 1:64	CBAtv 1:64	CBAtv 1:64	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
G	Branco	CBInat 1:128	CBInat 1:128	CBInat 1:128	CBAtv 1:128	CBAtv 1:128	CBAtv 1:128	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco
H	Branco	CBInat 1:256	CBInat 1:256	CBInat 1:256	CBAtv 1:256	CBAtv 1:256	CBAtv 1:256	CNTNeg	CNTNeg	CNTPos	CNTPos	Branco

CBInat = célula bacteriana de cultura de *S. intermedius* **inativada** por formaldeído

CBAtv = célula bacteriana de cultura de *S. intermedius* **ativa**.

Amostras de cultura de *S. intermedius*, inativada e ativa, foram distribuídas em tubos Eppendorf® e centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C, para separação de célula bacteriana e sobrenadante .

Após a centrifugação, 50µl de cada amostra (sobrenadante inativado e não inativado e célula bacteriana inativada e não inativada) em triplicata foram

adicionadas nas placas de 96 cavidades para reação, durante 30 minutos à temperatura de 25°C, ao abrigo da incidência direta de luz. O volume foi completado para 100µl com meio de Eagle sem soro fetal bovino.

Como controle positivo (100% de morte celular) foi considerado o sobrenadante da cultura de célula tratada com 10% de SDS antes de adicionar o MTT.

Para o controle negativo foi utilizado sobrenadante da cultura de célula não tratada com qualquer derivado de cultura de *S. intermedius* ou com solução 10 % de SDS (CNTPos). Foi considerado como ruído da reação/ (“background”) o meio de Eagle sem soro fetal bovino.

Foram removidos o meio de cultura e as amostras das placas e lavadas com solução balanceada de Hank's. Após a lavagem foi acrescentado 100 µl solução de MTT a 0,2% em meio de Eagle com 10% de soro fetal bovino. Após 4 hs foi retirada a solução de MTT e as células lavadas com solução balanceada de Hank's. A reação foi revelada com solução de 5% de SDS em 0,1M de HCl

Após a última reação foi feita a leitura espectrofotômetro de microplaca com comprimento de onda de 570nm (Absam).

O cálculo da porcentagem da citotoxicidade por dosagem foi determinado através da fórmula:

$$\% \text{ de morte celular} = \frac{\overline{Abs_{am}} - \overline{Abs_{CNTPos}}}{\overline{Abs_{CNTneg100\%}}} \times 100$$

Absam = absorbância em 570nm de qualquer amostra (sobrenadante ou célula bacteriana inativada ou não inativada) (SobINA, SobAT, CBInat, CBAtv).

Abscntpos = absorbância em 570nm do controle positivo (100% de morte celular, e concentração máxima de LDH)

Abscntneg = absorbância em 570nm do controle negativo (100% de sobrevida celular e concentração basal de LDH)

OBS. Todas as absorbâncias foram subtraídas do absorbância do ruído .

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de catalase, coagulase e suas respectivas inibições são ensaios de análise quantal (tudo ou nada). O teste de hemólise foi analisado

por Probitos e análise de variância ANOVA. Também por esta última foram analisados o teste de ELISA e de citotoxicidade.

Foi realizado o teste de Tukey para comparabilidade entre os grupos através do Software GraphPad Prism v.5.0.

Os dados de neutralização das atividades das exoenzimas bem como os dados do ensaio imunoenzimático foram analisados pelo teste t de student de modo a comparar as diferenças das médias entre a imunização intradérmica e intraperitoneal.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CURVA DE CRESCIMENTO DO *STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS*

A bactéria *Staphylococcus intermedius* cresceu em Caldo de Caseína de Soja Tripsinizado da BD® (TSB). Mostrando que este meio de cultivo foi excelente para o crescimento bacteriano.

Figura 5 - Curva de Crescimento do *Staphylococcus intermedius* em meio TSB

Taxa de Crescimento celular = $2,05 \text{ UO/mL}^{-h}$

Taxa Máxima de Crescimento celular $2,1 \text{ UO/mL}^{-h}$

UO = Unidade Opacimétrica

5.2 ULTRAFILTRAÇÃO

O sobrenadante da cultura celular submetido a filtração tangencial com filtro de fibra oca com “cut off” de 5kDa para eliminar proteínas de menor massa molecular e até que ela atingisse uma concentração mínima de 0,5mg/mL de proteínas, determinada pelo método de Bradford.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SOBRENADANTE E PRECIPITADO PELO MÉTODO DE BRADFORD

A concentração do sobrenadante contendo as exoproteínas do *Staphylococcus intermedius* foi de 0,519 µg por ml. A do precipitado contendo as células foi de 0,916 µg por ml.

Figura 6 – Curva padrão de dosagem de proteína com BSA (albumina sérica bovina)

5.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O resultado da eletroforese nos mostra as proteínas que foram reconhecidas.

Figura 7 – Fotografia mostrando a eletroforese utilizando Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare). A- Padrão de peso molecular; B- Precipitado (células); C- Sobrenadante (exoproteínas).

5.5 TESTE DA CATALASE EM TUBO

As amostras A, B, C e D foram testadas, sendo A- Sobrenadante ativo; B- Sobrenadante inativado; C- Precipitado ativo e D- Precipitado inativado.

O resultado do teste da catalase realizado em tubo com a amostra A foi positivo, confirmando que é uma bactéria catalase-positiva. Os grupos 3 e 4, que receberam sobrenadante por via intradérmica e intraperitoneal respectivamente, promoveram inibição da catalase até a diluição 1:4, seguido pelos grupos 7 e 8, que receberam associado pelas mesmas vias citadas e promoveram inibição nas diluições 1:2, conforme Quadro 4.

Figura 8 - Fotografia mostrando o teste de catalase com resultado positivo (esquerda) e controle negativo (direita).

Quadro 4 Inibição da catalase usando a amostra A (sobrenadante ativo)

Amostra	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
Diluição								
1:2	-	-	+	+	-	-	+	+
1:4	-	-	+	+	-	-	-	-
1:8	-	-	-	-	-	-	-	-
1:16	-	-	-	-	-	-	-	-

5.6 TESTE DA COAGULASE EM TUBO

O resultado do teste de coagulase em tubo foi positivo a partir de 2 horas de incubação, confirmando que a bactéria é coagulase-positiva.

Figura 9 - Fotografia mostrando o teste da coagulase com resultado positivo (acima) e controle negativo (abaixo).

Conforme demonstrado no Quadro 5, a imunização intradérmica responde bem semelhante à intraperitoneal e utilizando bem menos antígeno. Os grupos mais responsivos foram os imunizados com a amostra A.

Quadro 5 Inibição da coagulase usando a amostra A

Amostra	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
Diluição								
1:2	-	-	+	+	+	+	+	+
1:4	-	-	+	+	+	-	+	+
1:8	-	-	+	+	-	-	+	+
1:16	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 6 Inibição da coagulase usando a amostra C

Amostra	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
Diluição								
1:2	-	-	+	+	+	+	+	+
1:4	-	-	+	+	+	+	+	+
1:8	-	-	-	-	-	-	+	+
1:16	-	-	-	-	-	-	-	-

5.7 TESTE DE HEMÓLISE

A diluição ótima de hemácias foi de 21,43 μ L de papa de hemácia, sendo arredondado para 20 μ L, conforme resultado no gráfico 1.

A dose hemolítica 50% foi 1/11,29, porém a dose desafio para inibição da hemólise é 3x maior que essa concentração, portanto 1/3,76, arredondado para 1/4 do sobrenadante, determinado por Análise de Probitos.

Figura 10 – Determinação da Dose Hemolítica 50%

Curva Dose x Resposta da atividade hemolítica do sobrenadante da cultura de *Staphylococcus* spp.

Figura 11 – Inibição de 3X a Dose Hemolítica 50%

Figura 12 - Comparatividade da Dose Efetiva 50% (Dose Inibitória da Hemólise)

Diferença significativa ($P < 0,05$) somente entre os grupos 3 com o grupo 5 e o grupo 6 por Análise de Variância (ANOVA).

5.8 CITOTOXICIDADE POR MTT

A citotoxicidade celular foi determinada usando células L929 conforme descrito na norma ISO 10993-5 para citotoxicidade.

Os resultados obtidos estão no gráfico 2.

A dose citotóxica 50 % foi a diluição 1:60 e a dose desafio diluição 1:20. O grupo inoculado com PBS não apresentou inibição de toxicidade, sendo que os grupos 6 e 7, que receberam precipitado e associado respectivamente, neutralizaram parcialmente a citotoxicidade. Os outros grupos não tiveram diferença significativa.

Porém, se considerarmos os resultados podemos verificar que a inativação pelo formaldeído foi suficiente para inibir a toxicidade celular causada pelas exoproteínas e pela bacterina de *Staphylococcus intermedius*.

Figura 13 - Curva de Citotoxicidade do Sobrenadante da Cultura de *Staphylococcus spp*

Curva Dose X Resposta da citotoxicidade do sobrenadante da cultura de *Staphylococcus spp*.

Figura 14 - Inibição da Citotoxicidade por inoculação intradérmica

Grupo 1 – PBS; Grupo 3 – Sobrenadante inativado da cultura; Grupo 5 – Bacterina inativada; Grupo 7 – Bacterina + Sobrenadante inativados.

Figura 15 - Inibição da Citotoxicidade por inoculação intraperitoneal

Grupo 2 – PBS; Grupo 4 – Sobrenadante inativado da cultura; Grupo 6 – Bacterina inativada; Grupo 8 – Bacterina + Sobrenadante inativados.

Não há diferença significativa ($0,3 < P < 0,2$) entre os títulos de anticorpos neutralizantes da citotoxicidade por via intradérmica da via intraperitoneal.

Há diferença significativa ($P < 0,05$) entre a inoculação dos grupos inoculados com Sobrenadante inativado (Grupo 3 e Grupo 4) e Bacterina + sobrenadante inativados (Grupo 7 e Grupo 8) em relação ao controle de PBS independente da via de aplicação.

5.9 ELISA

Figura 16

Curva de Titulação por ELISA do Soro dos animais imunizados com sobrenadante de cultura inativado ou bacterina inativada ou sobrenadante associado a bacterina inativada de *Staphylococcus spp.*

Tabela 2

Best-fit values	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 7	GRUPO 8
BOTTOM	6,804	3,573	2,107	3,837	9,151	3,233
TOP	-0,07125	-0,1577	-0,05739	-0,08577	-0,1852	-0,1189
LOGIC50	-1,470	-1,556	-1,494	-1,012	-0,9267	-1,172

Figura 17

Titulo determinado pelo ensaio de ELISA dos soros dos animais imunizados com sobrenadante de cultura inativado ou bacterina inativada ou sobrenadante associado a bacterina inativada de *Staphylococcus spp.*

Houve diferença significativa do Grupo 3 com os outros Grupos * = ($P < 0,0001$).

Tabela 3

Teste de Tukey	Diferença das Médias.	q	Significancia? $P < 0.05?$	95% CI de diff
GRUPO 3 vs GRUPO 4	0,5993	4,757	Yes	0.02035 a 1.178
GRUPO 3 vs GRUPO 5	0,9062	7,192	Yes	0.3273 a 1.485
GRUPO 3 vs GRUPO 6	1,052	8,350	Yes	0.4731 a 1.631
GRUPO 3 vs GRUPO 7	0,8205	6,513	Yes	0.2416 a 1.399
GRUPO 3 vs GRUPO 8	1,028	8,157	Yes	0.4488 a 1.607

Teste de Tukey significativo somente para a mostras do GRUPO 3 em relação aos outros grupos. Não houve diferença significativa entre os outros grupos.

6 DISCUSSÃO

A taxa de crescimento celular e a taxa máxima de crescimento estão bem próximas, demonstrando que a fase exponencial de crescimento não difere da soma das fases lag, exponencial e estacionária.

Não existe bibliografia que determine a taxa de crescimento através da Unidade Opaciométrica (absorbância em 590nm) para *Staphylococcus intermedius*, porem os dados obtidos mostram uma curva caracteristica de crescimento bacteriano.

É importante lembrar que para o desenvolvimento de uma vacina é necessário que o estabelecimento do banco mestre e do banco trabalho de células estejam bem documentados de modo a se tornar fácil a rastreabilidade.

O perfil de proteínas foi caracterizado na eletroforese em SDS Page, revelando diversas bandas entre 30 e 45kDa, sendo compatível com os pesos moleculares da hemolisina alfa 33.2kDa (DONG J. et al., 2013), a hemolisina beta com 33.5kDa (DZIEWANOWSKA et al., 1996), as leucotoxinas, entre 35 e 37kDa (DINGES et al., 2000) e a proteína A com 42kDa (HUANG et al., 2004).

As provas realizadas com as exotoxinas demonstraram que as mesmas estavam ativas na cepa utilizada, como o da coagulase em plasma de carneiro, que coagula 26% do mesmo (TALAN et al., 1989) e o teste da catalase que mostrou a formação imediata de bolhas. Esses testes demonstraram que a bactéria apresentou os antígenos de interesse para futuros testes para a produção de uma vacina.

Essas exoproteínas criam um meio propício à colonização dos tecidos do hospedeiro, como a coagulase livre, que coagula o plasma por ativação da protrombina e depois transforma fibrinogênio em fibrina. No interior do coágulo ficam assim protegidas contra as defesas do hospedeiro (SANTOS et al., 2007). A catalase, que decompõe os radicais livres por oxirredução (dismutação) do peróxido de hidrogênio formados pelo sistema mieloperoxidase dentro dos fagócitos e assim evitam sua eliminação próximas (MARTINS, 1999). As hemolisinas, que lisam hemácias, utilizando-as como substrato, necrosam pequenos vasos também afetam leucócitos e plaquetas (DZIEWANOWSKA et. al., 2006).

Portanto, de grande importância foram os resultados obtidos com a inibição dessas exoproteínas através dos anticorpos presentes nos soros dos camundongos imunizados, pois dessa forma, os fatores de virulência, tão importantes à disseminação da bactéria, poderiam ser neutralizados, evitando a infecção.

O ensaio de citotoxicidade mostrou que o processo de destoxificação deu resultado, e que os produtos inativados, tanto o sobrenadante da cultura como a bacterina foram parcialmente inativados. O fato de terem sido parcialmente inativados é que o sistema celular é sensível a presença de elementos que modificam a osmolaridade, e neste caso isto pode ter acontecido quando se diluiu o sobrenadante ou a célula bacteriana inativada junto como meio de cultura para cultivo celular (DMEM). Porém o sistema demonstrou que houve diminuição de 10 vezes na citotoxicidade mediada pelo sobrenadante e de pelo menos 5 X menos na célula bacteriana.

A via intradérmica se apresentou como melhor opção de via de vacinação, com resultados semelhantes aos encontrados em vacinas para humanos, em que doses menores foram suficientes para promover imunidade similar ou superior à via intramuscular e intraperitoneal.

Como demonstrado no teste de ELISA, houve produção de anticorpo satisfatória e estatisticamente o sobrenadante deu melhor resposta que os outros, que é onde se encontram as exoproteínas.

A administração intradérmica de vacinas é uma técnica de inoculação simples, menos invasiva, rápida e segura (STICCHI et al., 2010). Esta oferece vantagens tanto na imunogenicidade como na redução da dose de antígeno inoculada, quando comparada com outras vias (HICKLING et al., 2011). Ela promove uma boa resposta imune em pessoas que tem baixa resposta e evita o uso de adjuvantes (STICCHI et al., 2010).

A possibilidade de administração de doses menores por via intradérmica podem ser úteis em campanhas de vacinações, por reduzir os custos (incluindo transporte e armazenamento) (HICKLING et al., 2011).

Da mesma forma que o resultado obtido neste estudo, podem ser utilizadas doses reduzidas de vacinas intradérmicas, resultando em resposta imune semelhante à dose padrão da via convencional, como para raiva e gripe em humanos (SANGARÉ, 2009),

A via intradérmica também se mostrou satisfatória na vacina de raiva testada em animais nos Estados Unidos, em que a soroconversão foi equivalente nas rotas intramuscular e intradérmica, sendo que nos gatos a intradérmica foi superior. Além disso, os títulos das intramusculares declinaram entre 55 e 259 dias, enquanto que a das intradérmicas aumentaram (OSÓRIO et al., 1999).

Porém, para a confecção de uma vacina profilática devemos atentar para o fato de já terem havido muitas tentativas sem sucesso. Recentemente foi publicado um estudo de uma vacina multi-antígenos para piodermite em humanos, que está na fase I dos testes clínicos e para tal se analisou o tipo de resposta que ocorre após infecção natural e se houve resposta de memória protetiva, além de tentar descrever o que pode predispor esse indivíduo à infecção e reinfecção. Experiências clínicas sugerem que alguns pacientes desenvolvem a imunidade protetiva, enquanto outros apresentam diversas recorrências. Os pacientes com defeito em células T claramente tem altas taxas de recorrência e acredita-se que a imunidade celular intacta resulte em memória imunológica, reduzindo o risco de reinfecções. O mais provável é que uma vacina que estimule tanto a imunidade celular quanto a humoral seja a melhor estratégia que resulte em uma vacina fortemente protetiva contra o *Staphylococcus* (SPELLBERG; DAUM, 2012).

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

1. As formulações de antígenos utilizadas como sobrenadante inativo, célula bacteriana inativa e associação de célula e sobrenadantes intativos, mostraram ser competentes para a produção de anticorpos neutralizantes das exotoxinas testadas e também como reativas no testes imunoenzimático. Porém a melhor formulação que apresentou bons títulos de anticorpos neutralizantes foi a formulação obtida somente com o sobrenadante inativo.
2. Em relação a via de inoculação, tanto a via intraperitoneal como a intradérmica foram satisfatória para a produção de anticorpos. Contudo, apesar de não haver diferença significativa há uma tendência da resposta intradérmica ter sido ligeiramente melhor do que a intraperitoneal.
3. A formulação com sobrenadante inativado foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes das principais exotoxinas testadas, tais como catalase, coagulase, hemolisina e citotoxicidade.
4. O método imunoenzimático apresenta ser um ensaio que possa ser empregado para o teste de potência da vacina, necessitando ser melhor desenvolvido e validado para esta finalidade. Em função da quantidade de amostra de soro dos animais não foi possível desenvolver a metodologia completa para determinação da potência, sendo necessário a produção de soros de referência para a validação do ensaio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFOLTER, V.K.; MOORE, K. Histologic features of normal canine and feline skin. **Clinics in Dermatology**, v. 12, p. 491-497, 1994.
- ANDERSON, J.C. Staphylococcus. In: GYLES, C. L. & THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Ames: Iowa State University Press, p. 14-20, 1986.
- ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI L., AND MONTANARO, L. 2001. Presence of *oficaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151-2156, 1993.
- BACHA, W.J.; WOOD, L.M. Color atlas of veterinary histology. Lea and Febiger, Philadelphia. 269p, 1990
- BANKS, W.J. Histologia Veterinária Aplicada. 2ª ed. Manole, São Paulo. 629p., 1992
- BANNOEHR, J.; BROWN, J.K.; SHAW, D.J.; FITZGERALD, R.J.; VAN DEN BROEK, A.H.; THODAY, K.L. *Staphylococcus pseudintermedius* surface proteins SpsD and SpsO mediate adherence to ex vivo canine corneocytes. **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 119–126, 2012.
- BECKER, A.M.; JANIK, T.A.; SMITH, E.K.; SOUSA, C.A.; PETERS, B.A. *Propionibacterium acnes* immunotherapy in chronic recurrent canine pyoderma. An adjunct to antibiotic therapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 3(1), p. 26-30, 1989.
- BORKU, M.K.; OZKANLAR, Y.; HANEDAN, B. AND DURU, S.Y. Efficacy of staphylococcal bacterin for treatment of canine recurrent pyoderma: an open clinical Trial. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 158, n. 5, p. 234-238, 2007.
- BRAGULLA, H.; BUDRAS, K.D.; MÜLLING, C.; REESE, S. A.; KÖNIG, H.E. Tegumento comum, p.325-380. In: König H.E. & Liebick H.G. (Ed.), **Anatomia dos Animais Domésticos: texto e atlas colorido**. Artmed, Porto Alegre, v.2, 399p., 2004.
- CURTIS, C.F.; LAMPORT, A.I. and 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**, v. 17, 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**, v. 51, p. 636-639, 1990.

DEBOER, D.J. Canine staphylococcal Pyoderma. **U.S. Companion Animal Health**, 2006.

DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1569-1573, 2005.

[DINGES, M. M.](#); [ORWIN, P. M.](#); [SCHLIEVERT, P. M.](#) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Minnesota, v. 13, n.1, p. 16–34, 2000.

DONG, J.; QIU, J.; ZHANG, Y.; LU, C.; DAI, X.; WANG, J.; LI, H.; WANG, X.; TAN, W.; LUO, M. NIU, X.; DENG, X. Oroxylin A Inhibits Hemolysis via Hindering the Self-Assembly of α -Hemolysin Heptameric Transmembrane Pore. **PLoS Computational Biology**, v. 9(1), p. e1002869, 2013.

DZIEWANOWSKA, K.; EDWARDS, V.M.; DERINGER, J.R.; BOHACH, G.A.; GUERRA, D.J. Comparison of the beta-toxins from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 335, p. 102-108, 1996.

DUQUETTE, R.A.; NUTTALL, T.J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? **Journal of Small Animal Practice**, v. 45 p. 591–597, 2004.

FINNEY, D.J., **Probit Analysis**. Cambridge, England, Cambridge University Press., 1971.

FITZGERALD, J.R. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. **Veterinary Dermatology**, v. 20. p. 490-495, 2009.

FOSTER, T.J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 948-958, 2005.

FUTAGAWA-K, S.; SAKURAI, N.; BA-THEIN, W.; FUKUYASU, T. Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. **BMC Veterinary Research**, v.26, p. 2-4, 2006.

GEORGIEVA, R.N. Produção de biofilme em *Staphylococci* isolados da pele de cães. Universidade Técnica de Lisboa, 82p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária), 2012.

GRAU, H.; WALTER, P. 1975. **Histología y Anatomía Microscópica Comparada de los Mamíferos Domésticos**. Labor, Barcelona. 210p., 1975

- HARGIS, A.M.; GINN, P.E. 2007. The integument, p.1107-1261. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Ed.), **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis. 1476p.
- HASHIDA, S.; HASHINAKA, K.; ISHIKAWA, E. Ultrasensitive enzyme immunoassay. **Biotechnology Annual Review**, v. 1, p. 403-451, 1995.
- HAUSCHILD, T.; WOJCIK, A. Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. **Research in veterinary science**, v. 82, n. 1, p. 1–6, 2007.
- HEADINGTON J.T.; CÉRIO R. 1990. Dendritic cells and the dermis. **American Journal of Dermatopathology**, v. 12, n.217.
- HENDRICKS, A.; SCHUBERTH, H. J.; SCHUELER, K.; LLOYD, D. H. Frequency of superantigen-producing *Staphylococcus intermedius* isolates from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of superantigens in dogs. **Research in veterinary science**, v. 73, n. 3, p. 273–277, 2002.
- HERMANS, K.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK F. (2010) *Staphylococcus*. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Eds CL Gyles, JF Prescott, JG Songer, CO Thoen. Wiley-Blackwell, Ames, IA, USA. p 75–89
- HICKLING, J.K.; JONES, K.R.; FRIEDE, M.; ZEHRUNG, D.; CHEN, D.; KRISTENSEN, D. Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges. **Bull World Health Organ**, v. 89, p. 221–226, 2011.
- HU, D.L.; OMOE, K.; NARITA, K.; CUI, J.C.; SHINAGAWA, K.; NAKANE, A. Intranasal vaccination with a double mutant of staphylococcal enterotoxin C provides protection against *Staphylococcus aureus* infection. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 2841-2848, 2006.
- HUANG, S.H.; CHANG, T.C. Detection of *Staphylococcus aureus* by a sensitive immuno-PCR assay. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 1673-1674, 2004.
- JANSEN, T.; HOFMANS, M.P.M.; THEELEN, M.J.G.; MANDERS, F.; SCHIJNS, V.E.J.C. Structure and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. **Vaccine**, v. 24, n. 26, p. 5400-5405, 2006.
- KIM, T.J.; NA, Y.R.; LEE, J.I. Investigations into the basis of chloramphenicol and tetracycline resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from cases of pyoderma in dogs. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 52, n. 3, p. 119–124, 2005.
- KIM, Y.C.; JARRAHIAN, C.; ZEHRUNG, D.; MITRAGOTRI, S.; PRAUSNITZ, M.R. Delivery systems for intradermal vaccination. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 351, p.77–112, 2011.
- KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN,

R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 Ed. Washington: American Society for Microbiology. Chap.16, p.264-282, 1999.

KRISHNA, S.; MILLER, L.S. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, p. 261–280, 2012.

KRISTENSEN, S. A study of skin diseases in dogs and cats. I. Histology of the hair skin of dogs and cats. **Nord. Vet. Med.**, v. 27, p. 593-603, 1975.

KÜHNEL, W. 2005. **Citologia, Histologia e Anatomia Microscópica: texto e atlas**. 11ª ed. Artmed, Porto Alegre. 535p.

LAMBERT, P.H.; LAURENT, P.E. Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform vaccine administration? **Vaccine**, v. 26, n.3, p. 197-208, 2008.

LAI, Y.; COGEN, A.L.; RADEK, K.A.; PARK H.J.; MACLEOD, D.T., LEICHTLE, A.; RYAN, A.F.; DI, N.A.; GALLO, R.L. (2010) Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, p. 2211–2221, 2010.

LARSSON JR, CE. Estudo comparativo da eficácia da imunoterapia com bacterina e de dois esquemas de pulsoterapia antibiótica no manejo de piodermite superficiais idiopáticas recidivantes caninas. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2008.

LEINIKKI, P.O.; PASSILA, S. Quantitative, semiautomated, enzyme-linked immunosorbent assay for viral antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 136 Suppl, p. 294-299, 1977.

LEVY, C.E. Aspectos Microbiológicos. In: RODRIGUES, E.A.C.; MENDONÇA, J.S.; AMARANTE, J.M.B.; FILHO, M.B.A.; GRINBAUM, R.S.; RICHTMANN, R. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, p. 591-598, 1997.

LLOYD, D.H.; GARTHWAITE, G. 1982. Epidermal structure and surface topography of canine skin. **Research in Veterinary Science**, v. 33, n. 99, 1982.

LODMELL, D.L.; EWALT, LC; PARNELL, M.J.; RUPPRECHT, C.E.; HANLON, C.A. One-time intradermal DNA vaccination in ear pinnae one year prior to infection protects dogs against rabies virus. **Vaccine**, v.24, p. 412–416, 2006.

MARTINS, L.T. Microbiologia: *Staphylococcus*. 3rd ed. São Paulo: Atheneu, p.149-156, 1999.

MATHERS, A.R.; LARREGINA, A.T. Professional antigen-presenting cells of the skin. **Immunologic Research**, v. 36, p. 127-136, 2006.

MCCALL, C.A.; COHEN, J.J. Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v.97, p. 111-114, 1991.

MCKEE P.H. 1999. **Essential Skin Pathology**. Mosby, London. 250p.

MEYER, W.; SCHWARZ, R.; NEURAND, K. The skin of domestic mammals as model for the human skin, with special reference to the domestic pig. **Current Probl. Dermatology**, v. 7, p. 32-59, 1978.

MILLER, L.S. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol*, v. 24, p. 71-87, 2008.

MILLER, L.S.; CHO, J.S. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat Rev Immunol*, v.11, p. 505-518, 2011.

MONTAGNA, W. Comparative anatomy and physiology of the skin. **Arch. Dermatol.** v. 96, p. 357-363, 1967.

MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; STINSON, A.W.; CALHOUN, H.L. 1993. Integument, p.285-312. In: Dieter-Dellmann H. (Ed.), **Textbook of Veterinary Histology**. 4th ed. Lea and Febiger, Philadelphia. 351p.

MORRIS, D.O.; ROOK, K.A.; SHOFR, F.S.; RANKIN, S.C. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 332–337, 2006.

NICOLAS, J.F.; GUY, B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. **Expert Rev Vaccines**, v.7, n.8, p.1201-1214, 2008.

OSORIO, J.E.; TOMLINSON, C.C.; FRANK, R.S.; HAANES, E.J.; RUSHLOW, K.; HAYNES, J.R.; STINCHCOMB, D.T. Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. **Vaccine**, v.17, n.9-10, p.1109–1116, 1999.

PUKAY, B.P. Treatment of canine bacterial hypersensitivity by hyposensitization with *Staphylococcus aureus* bacterin-toxoid. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.21, n.4, p.475-483, 1985.

QUINN, P.J.; MAREKY, B.K.; CARTER, M.E.; DONELLY, W.J.C.; LEONARD F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.55-60.

REIS E SOUSA, C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. **Current Opinion in Immunology**, v.16, n.1, p.21–25, 2004.

RUBIN, J.E.; BALL, K.R.; CHIRINO-TREJO, M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. **The Canadian Veterinary Journal**, v.52, n.2, p. 153-157, 2011.

SANGARÉ, L.; MANHART, L.; ZEHRUNG, D.; WANG, C.C. Intradermal hepatitis B vaccination: a systematic review and meta-analysis. **Vaccine**, v.27, n.12, p.1777–1786, 2009.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.6, p. 413-423, 2007.

SCHMITT, D. Cellules dendritiques et allergie cutanée: la cellule de Langerhans dans l'allergie de contact et les tests prédictifs *in vitro*. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**, v.37, n.3, p. 243-252, 1997.

SCOTT D.W. Feline dermatology 1900-1978: A monograph. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.16, p.331-459, 1980.

SCOTT, D.W.; MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. 6.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. 1528p.

SCOTT, D.W.; PETERS, J.; WILLIAM, H.; MILLER Jr. Efficacy of orbifloxacin tablets for the treatment of superficial and deep pyoderma due to *Staphylococcus intermedius* infection in dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v.47, n.10, p.999-1002, 2006.

SIMANSKI, M.; DRESSEL, S.; GLÄSER, R.; HARDER, J. RNase 7 protects healthy skin from *Staphylococcus aureus* colonization. **Journal of Investigative Dermatology**, v.130, n.12, p.2836-2838, 2010.

SLETTEMEÅS, J.S.; MIKALSEN, J.; SUNDE, M. Further diversity of the *Staphylococcus intermedius* group and heterogeneity in the Mbol restriction site used for *Staphylococcus pseudintermedius* species identification. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, n.5, p.756–759, 2010.

SOUZA, C.; WARTH, J.F.G.; AGOTTANI, J.V.B.; MOURA, J.; MALUTA, R.P.; CARDOZO, M.V.; ÁVILA, F.A. Utilização de modelo biológico experimental na ação soroneutralizante de toxinfecção sistêmica por cepa de *Staphylococcus pseudintermedius*. **Ars veterinaria**, v.28, n.1, p.22-27, 2012.

SPELLBERG, B.; DAUM, R. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. **Seminars in Immunopathology**, v.34, n.2, p.335-348, 2012.

SUMMERS, J.F.; BRODBELT, D.C.; FORSYTHE, P.J.; LOEFFLER, A.; HENDRICKS, A. The effectiveness of systemic antimicrobial treatment in canine superficial and deep pyoderma: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, v.23, n.4, p.305-329, 2012.

STICCHI, L.; ALBERTI, M.; ALICINO, C.; CROVARI, P. The intradermal vaccination: past experiences and current perspectives. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v.51, p.7-14, 2010.

TALAN, D.A.; STAATZ, D.; STAATZ A.; GOLDSTEIN, E.J.; SINGER, K.; OVERTURF, G.D. *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, v.27, n.1, p.78-81, 1989.

TEIXEIRA, L.M.; BUERIS, V.; TRABULSI, L.R. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap.20, p.175-187.

URMACHER, C.D. Normal skin. In: STERNBERG S.S., **Histology for Pathologist**. 2.ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1997, cap.1, p.25-45.

YAGER, J.A.; WILCOCK, B.P. **Color Atlas and Text of Surgical Pathology of the Dog and Cat: Dermatopathology and skin tumors**. London : Wolfe, 1994. 320p.

WAISGLASS, S. New perspectives on pyoderma – Something old and something new. In: WESTERN VETERINARY CONFERENCE, 81, Las Vegas, 2009.

WEBB, A.J.; CALHOUN, M.L. The microscopic anatomy of the skin of mongrel dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.15, n.55, p.274-280, 1954.

WEESE, J.S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.418-429, 2010.

Wikipedia, the free encyclopedia. BALB/c. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/BALB/c>>. Acesso em: 25 Junho 2013.

Wikipedia, the free encyclopedia. Staphylococcus. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus>>. Acesso em: 03 Janeiro 2014.

WOLLENBER, G.A., MOMMAAS, M.; OPPEL, T.; SCHOTTDORF, E.M.; GÜNTHER, S.; MODERER, M. Expression of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n.1, p. 43-50, jan. 2006.

Anexar:

Ficha do aluno (cópia)

Certificado Comissão de Ética

Normas Específicas da CPG da FCF-USP

- ***Xerocar a Ficha Catalografica ou imprimir no verso da folha de rosto***
- ***Corrigir Capa Dura, colocando:***

Dissertação para Obtenção do Grau de M...

Orientador: