

# Proteção de cães por 13 meses contra *Bordetella bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canino com uma vacina viva modificada

A. A. G. JACOBS, R. P. H. THEELEN, R. JASPERS, I. J. I. HORSPOOL, D. SUTTON, J. G. H. B. BERGMAN, G. PAUL

Doze filhotes livres de patógeno específico (SPF) foram vacinados por via intranasal com uma vacina viva modificada, bivalente contra traqueobronquite infecciosa (grupo 1) e seis filhotes da mesma idade e da mesma fonte serviram como controles não vacinados (grupo 2). Ambos os grupos foram provocados com *Bordetella bronchiseptica* tipo selvagem e vírus da parainfluenza canina por aerossol 56 semanas depois que o grupo 1 havia sido vacinado, e ao mesmo tempo seis filhotes SPF de 10 semanas de idade e da mesma fonte (grupo 3) também foram submetidos à provocação. *Swabs* oronasais foram coletados regularmente antes e depois da provocação, para o isolamento de bactérias e vírus, e os cães foram observados quanto aos sinais clínicos por três semanas após a provocação. Os cães de controle se tornaram positivos para cultura para *B. bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina, mas os produtos do isolamento do grupo vacinado foram significativamente menores ( $P < 0.05$ ). Os escores clínicos médios do grupo vacinado foram 61 por cento menores do que os escores do grupo 2 ( $P = 0.009$ ), e 90 por cento menores do que os escores do grupo 3 ( $P = 0.001$ ).

A traqueobronquite infecciosa canina ou 'tosse canina' é uma doença do trato respiratório superior contagiosa, multifatorial de cães, que é particularmente comum onde cães de diferentes origens são misturados, por exemplos em *pet shops* ou em exposições caninas, abrigos de resgate e canis de acolhimento (Ford e Vaden 1998). Uma variedade de organismos patogênicos pode estar envolvida nesta etiologia. *Bordetella bronchiseptica*, um bacilo pequeno, móvel, Gram-negativo, é geralmente considerado como sendo o organismo causal mais importante (Bemis e outros 1977a, Tischler e Hill 1977, McCandlish e outros 1978), embora diversos outros agentes infecciosos como o vírus da parainfluenza canina (McCandlish e outros 1978), adenovírus canino e espécies de *Mycoplasma* possam estar envolvidos. Além disso, outros fatores como estresse e condições de alojamento insatisfatórias podem contribuir para o desenvolvimento da doença.

A vacinação tem um papel importante na prevenção da doença, e dois tipos principais de vacina são utilizados: primeiro, vacinas injetáveis (parenterais) contendo células inteiras inativadas ou fímbrias purificadas de *B. bronchiseptica* e/ou vírus da parainfluenza canina inativado ou vivo; e segundo, vacinas vivas modificadas para administração intranasal contendo *B. bronchiseptica* vivo, avirulento, com ou sem vírus da parainfluenza canina. Essas vacinas intranasais vivas modificadas estimulam a imunidade local e, assim, proporcionam proteção contra infecção, bem como contra doença. Além disso, elas evitam o risco de reações locais (no local da injeção) e também podem ser utilizadas em filhotes muito jovens, porque é menos provável que o anticorpo materno interfira com a 'tomada' da vacina (Appel e Binn 1987).

Muitos cães estarão em risco de traqueobronquite infecciosa canina por apenas um curto período em cada ano, por exemplo, se foram acolhidos em um canil durante um feriado anual, mas outros podem estar em risco por muito mais tempo, por exemplo, se estiverem em um programa de treinamento que dure uma temporada inteira, ou por diversos períodos a cada ano. Para esses cães, uma vacina que proporciona imunidade que dure por pelo menos um ano seria a escolha ideal. Este trabalho descreve um estudo no qual a proteção proporcionada por uma vacina intranasal bivalente, viva, modificada, contra *B. bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina foi testada em cães submetidos à provocação com *B. bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina 56 semanas depois que terem sido vacinados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Desenho experimental

Dezoito filhotes de Beagle livres de patógeno específico (SPF) de ambos os sexos foram obtidos da colônia de SPF da Intervet in Lelystad, Países Baixos. Eles foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo 1 consistiu de 12 filhotes que deveriam ser vacinados, e o grupo 2 consistiu dos seis filhotes restantes, que serviram como controles não vacinados.

Os filhotes foram alojados na unidade de SPF juntamente com suas mães até que tivessem três semanas de idade, quando foram vacinados, desmamados e mudados para salas de isolamento separadas, onde permaneceram até serem submetidos à provocação. Os 12 filhotes do grupo 1 foram vacinados uma vez com uma vacina intranasal viva contra *B. bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina. Cinquenta e seis semanas depois, os cães dos grupos 1 e 2 foram submetidos a uma provocação combinada de *B. bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina. Ao mesmo tempo, seis filhotes SPF de 10 semanas de idade da mesma fonte (grupo 3) foram submetidos à provocação da mesma forma.

### Vacina e vacinação

A vacina foi um lote comercial de uma vacina viva modificada contendo *B. bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina (Nobivac KC; Intervet International) sem adjuvante. A vacina estava na forma liofilizada e fornecida com um diluente; 0.4 ml da vacina reconstituída foi administrado em uma narina de cada um dos filhotes do grupo 1.

### Cepas da provocação

Uma mistura de três cepas de *B. bronchiseptica* frescamente desenvolvidas foi utilizada. As três cepas foram a cepa D-2 (Kontor e outros 1981), a cepa Bb7 (um isolado holandês) e a cepa B1331RP274 (uma cepa obtida do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos). O inóculo da provocação foi preparado como segue: as três cepas liofilizadas foram inoculadas em ágar sangue e incubadas aerobicamente por 48 horas a 37 °C. O crescimento nas placas, foi então, inoculado em caldo triptose fosfato e incubado aerobicamente por 18 horas a 37 °C. As culturas individuais continham aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colônia (ufc) de cada cepa por ml. Volumes iguais foram misturados e utilizados na provocação. Depois da provocação, uma contagem viva da cultura misturada estabeleceu que ela continha  $1.3 \times 10^{10}$  ufc/ml.

Veterinary Record (2005)  
157, 19-23

A. A. C. Jacobs, PhD,  
R. P. H. Theelen, BSc,  
R. Jaspers, BSc,  
I. J. I. Horspool, BVMS,  
PhD, DipECVPT, MRCVS,  
G. Paul, DVM, PhD,  
Intervet International, Wim  
de Körverstraat 35, PO Box  
31,5830 AA Boxmeer,  
Países Baixos  
D. Sutton, BVetMed,  
MRCVS,  
J. G. H. E. Bergman, DVM,  
Intervet UK, Walton Manor,  
Milton Keynes MK7 7AJ

O endereço atual do Sr.  
Sutton é Intervet  
International, Wim de  
Körverstraat 35, PO Box  
31, 5830 AA Boxmeer,  
Países Baixos

**TABELA 1:** Sistema de pontuação quanto aos sinais clínicos de doença do trato respiratório superior em cães infectados com *Bordetella bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina

Parâmetro	Escore	Descrição
Temperatura	0	<39.5 °C
	1	39.5-39.9 °C
	2	40.0-40.4 °C
Conduta geral	3	>40.4 °C
	0	Normal
	1	Deprimida
Olhos	2	Gravemente deprimida
	0	Normal
	1	Secreção clara
Nariz	2	Secreção mucopurulenta
	0	Normal
	1	Secreção clara
Respiração	2	Secreção mucopurulenta
	0	Normal
	1	Tosse espontânea com exercício
Palpação laríngea	2	Tosse espontânea em repouso
	0	Normal
	1	Tosse ocasional ou leve
Palpação traqueal	2	Tosse frequente ou grave
	0	Normal
	1	Tosse ocasional ou leve
Auscultação	2	Tosse frequente ou grave
	0	Normal
	1	Congestão ou estertores secos
	2	Estertores úmidos
	3	Área(s) consolidada(s) (sem som)

A cepa D008 (ATCC, EUA) de vírus da parainfluenza canina a um título de  $10^{7.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml, conforme determinado por titulação em células Vero, armazenadas abaixo de -50 °C, foi utilizada para a provocação.

Para a provocação com *B bronchiseptica*, grupos de seis cães foram colocados em um isolador medindo 0.7 x 0.7 x 1.5 m e expostos a um aerossol de 30 ml da cultura utilizada na provocação. Dentro de duas horas da provocação com *B bronchiseptica*, 200 µl do material utilizado na provocação com parainfluenza canina foram administrados em cada narina e 600 µl foram administrados por via oral. Subsequentemente, grupos de seis cães foram colocados no isolador novamente e expostos a uma dose de aerossol de 25 ml de 3 x o material utilizado na provocação com vírus da parainfluenza canina diluído durante 15 minutos utilizando um nebulizador (DeVilbiss).

#### Isolamento de *B bronchiseptica*

*Swabs* nasais foram coletados de todos os cães pouco antes de terem sido submetidos à provocação e, então, duas vezes por semana por três semanas. Os *swabs* foram colocados em 1.5 ml de meio de transporte (solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco). Dentro de duas horas da amostragem, uma série de diluições ( $10^0$  a  $10^{-3}$ ) foi preparada de cada suspensão de *swab* e 0.1 ml de cada diluição foi colocada em placa em ágar Bordet Gengou base (Difco) suplementada com 0.004 por cento de cefalexina e incubada aerobicamente por 48 horas a 37 °C. O ágar seletivo tornou fácil identificar *B bronchiseptica* pela morfologia típica de suas colônias, e o número de ufc por placa foi contado. Colônias suspeitas de cada cão positivo foram clonadas em ágar sangue e incubadas aerobicamente a 37 °C por 24 a 48 horas. Em cada dia ela foi isolada, uma dessas culturas puras idênticas foi escolhida aleatoriamente e sua identidade foi confirmada por coloração Gram, a reação de oxidase (Biomérieux) e API 20 NE (bioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados são apresentados como log<sub>10</sub> ufc/ml de suspensão de *swab*.

#### Isolamento de vírus da parainfluenza canina

*Swabs* nasais foram coletados pouco antes da provocação e dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, 10, 15 e 21 dias depois da provocação. Os *swabs* foram colocados em 3 a 4 ml de meio de cultura de tecido em gelo e armazenados abaixo de -50 °C até uso adicional. Depois do

descongelamento, a suspensão de *swab* em cada amostra foi utilizada para isolamento viral em células Vero. Diluições de dez vezes foram feitas em quadruplicata e células Vero foram adicionadas. As culturas celulares foram examinadas quanto à presença de um efeito citopático (cpe) típico do vírus da parainfluenza canina por até sete dias. Além disso, os sobrenadantes de culturas celulares negativas para cpe foram examinadas quanto à presença de uma reação de hemaglutinação positiva com hemácias porcinas. Os resultados são apresentados como log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml de suspensão de *swab*.

**TABELA 2:** Títulos de anticorpos séricos para *Bordetella bronchiseptica* nos três grupos de cães após vacinação intranasal com uma vacina bivalente contendo *B bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina

Grupo	Cão	Na vacinação	Título de anticorpos Em 30 semanas	Em 56 semanas (provocação)
1	1	<3.0	3.8	4.7
	2	<3.0	4.9	5.6
	3	<3.0	4.1	<3.0
	4	<3.0	5.9	5.2
	5	<3.0	5.0	4.6
	6	<3.0	3.8	3.6
	7	<3.0	<3.0	<3.0
	8	<3.0	4.2	3.6
	9	<3.0	<3.0	<3.0
	10	<3.0	<3.0	<3.0
	11	<3.0	3.7	5.7
	12	<3.0	<3.0	<3.0
	Média	<3.0	<4.0	<4.0
2	1	<3.0	<3.0	<3.0
	2	<3.0	<3.0	<3.0
	3	<3.0	<3.0	<3.0
	4	<3.0	<3.0	<3.0
	5	<3.0	<3.0	<3.0
	6	<3.0	<3.0	<3.0
	Média	<3.0	<3.0	<3.0
3	1	-	-	<3.0
	2	-	-	<3.0
	3	-	-	<3.0
	4	-	-	<3.0
	5	-	-	<3.0
	6	-	-	<3.0
	Média	-	-	<3.0

Grupo 1 Cães vacinados, Grupo 2 Cães de controle selecionados da mesma fonte ao mesmo tempo, Grupo 3 filhotes de controle de 10 semanas de idade da mesma fonte

#### Amostragem sanguínea

Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular de todos os cães quando eles foram vacinados, 30 semanas depois e quando eles foram submetidos à provocação. Depois de permitir que o sangue coagulasse, o soro foi aquecido e inativado a 56 °C por 30 minutos e, então, armazenado abaixo de -15 °C até que ele fosse testado quanto a anticorpos para *B bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina.

#### Sorologia para *B bronchiseptica*

Um ELISA, utilizando fímbrias de *B bronchiseptica* purificadas como antígeno de revestimento, foi utilizado conforme descrito por Jacobs e outros (1993). Resumidamente, após o revestimento e lavagem, diluições seriadas de duas vezes dos soros em teste foram realizadas. Após incubação e lavagem, o anticorpo ligado foi quantificado utilizando um conjugado anticorpo marcado com peroxidase. Os títulos foram calculados comparando-se com um soro padrão, que foi utilizado em cada teste. As amostras com títulos maiores do que 2<sup>3</sup> foram consideradas positivas.

#### Sorologia para parainfluenza canina

Anticorpos para vírus da parainfluenza canina foram determinados em um ensaio de neutralização viral. Diluições de duas vezes em série de soro foram preparadas em placas de microtítulo e misturadas com um volume igual contendo vírus da parainfluenza canina (250 TCID<sub>50</sub>/50 µl). Após a pré-incubação, células vero foram adicionadas. As células foram submetidas a cultura por pelo menos cinco dias e, então, examinadas quanto à presença de um cpe típico. Os títulos são apresentados como o recíproco da diluição mais elevada na qual todos os vírus foram neutralizados, isto é, sem cpe. As amostras

produzindo neutralização em diluições acima de 2<sup>3</sup> foram consideradas positivas.

**TABELA 3: Títulos de anticorpos séricos para vírus da parainfluenza canina nos três grupos de cães após vacinação intranasal com uma vacina bivalente contendo Bordetella bronchiseptica e vírus da parainfluenza canina**

Grupo	Cão	Título de anticorpos		
		Na vacinação	Em 30 semanas	Em 56 semanas (provocação)
1	1	<3*0	5*0	4*0
	2	<3*0	6*0	5*0
	3	<3*0	6*0	6*0
	4	<3*0	7*0	7*0
	5	<3*0	6*0	5*0
	6	<3*0	6*0	7*0
	7	<3*0	5*0	6*0
	8	<3*0	3*0	3*0
	9	<3*0	4*0	6*0
	10	<3*0	6*0	8*0
	11	<3*0	3*0	4*0
	12	<3*0	3*0	4*0
	Média	<3*0	5*0	5*4
2	1	<3*0	<3*0	<3*0
	2	<3*0	<3*0	<3*0
	3	<3*0	<3*0	<3*0
	4	<3*0	<3*0	<3*0
	5	<3*0	<3*0	<3*0
	6	<3*0	<3*0	<3*0
	Média	<3*0	<3*0	<3*0
3	1	-	-	<3*0
	2	-	-	<3*0
	3	-	-	<3*0
	4	-	-	<3*0
	5	-	-	<3*0
	6	-	-	<3*0
	Média	-	-	<3*0

Grupo 1 Cães vacinados, Grupo 2 Cães de controle selecionados da mesma fonte ao mesmo tempo, Grupo 3 filhotes de controle de 10 semanas de idade da mesma fonte

**Exame clínico e pontuação**

Um técnico treinado observou os cães quanto a quaisquer sinais clínicos adversos todos os dias ao longo do estudo. No dia da provocação e, então, diariamente por três semanas, a temperatura retal dos cães foi medida, um exame clínico completo foi realizado e eles receberam uma pontuação clínica numérica de acordo com o sistema mostrado na Tabela 1. Temperaturas retais acima de 39.4 °C foram consideradas como indicativas de piroxia.

**Análise estatística**

Os escores clínicos totais e os dados de reisolamento de *B bronchiseptica* e parainfluenza canina foram analisados utilizando o teste de Mann-Whitney U. A hipótese nula foi testada bilateralmente em um nível de significância (α) de 0.05 (Statistix para Windows, versão 2.0; Analytical Software). As temperaturas retais foram analisadas por meio de um teste t de duas amostras (Microsoft Excel 2000; Microsoft).

**RESULTADOS**

**Status dos filhotes antes da provocação**

Todos os filhotes do grupo 1 eram negativos para *B bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina por sorologia e isolamento antes de serem vacinados, e todos os filhotes dos grupos 2 e 3 eram negativos para *B bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina por sorologia e isolamento até que fossem submetidos à provocação.

**Respostas sorológicas à vacinação**

Oito dos 12 cães vacinados desenvolveram títulos de anticorpos séricos baixos a moderados para *B bronchiseptica*, mas os outros quatro permaneceram soronegativos (Tabela 2). Depois de serem vacinados, todos os cães do grupo 1 soroconverteram para vírus da parainfluenza canina (Tabela 3).

**Temperatura retal**

As temperaturas retais médias dos cães em cada grupo são apresentadas na Tabela 4. Depois da provocação, os cães do grupo 1 apresentaram temperaturas corporais médias menores do que os cães dos grupos 2 e os filhotes do grupo 3; as diferenças alcançaram significância estatística nos dias 2, 3, 4, 5, 12, 20 e 21 depois da provocação em comparação com o grupo 2, e nos dias 2, 3, 5, 11, 12, 13, 18 e 21 em comparação com o grupo 3.

**Sinais clínicos**

Nenhuma reação adversa foi observada depois que os filhotes do grupo 1 foram vacinados, e todos os filhotes permaneceram clinicamente saudáveis até o dia da provocação.

Os escores clínicos diários médios dos cães nos três grupos são mostrados na Tabela 5. Os filhotes do grupo 3 desenvolveram sinais clínicos claros depois que foram submetidos à provocação, incluindo piroxia, tosse espontânea ou induzida e secreções nasais e/ou oculares claras ou mucopurulentas. Os cães do grupo 2 apresentaram sinais semelhantes, mas mais leves, mas os cães vacinados quase não apresentaram sinais. Os escores clínicos totais dos cães do grupo 1 foram 61 por cento menores do que os escores do grupo 2 (P=0.009), e 90 por cento menores do que os escores do grupo 3 (P=0.001).

**Isolamento de B bronchiseptica**

Após a provocação, os filhotes do grupo 3 se tornaram muito infectados por *B bronchiseptica*, que foi isolado em grandes números ao longo do período de teste de três semanas (Tabela 6); os resultados do grupo 2 foram menores do que os do grupo 3, mas todos os cães se tornaram positivos para a cultura. Os números menores de bactérias foram isolados dos cães vacinados do grupo 1, e foram significativamente menores do que os números isolados do grupo 3 para todos os dias de amostragem (P<0.05); dois dias depois da provocação eles também foram significativamente menores do que os números isolados do grupo 2 (P<0.05).

**TABELA 4: Temperaturas retais médias (dp) dos três grupos de cães depois de terem sido submetidos à provocação com bordetella bronchiseptica e vírus da parainfluenza canina 56 semanas depois de o grupo 1 ter sido vacinado**

Grupo	Dia depois da provocação																						
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	38.8 (0.4)	39.2 (0.4)	39.1 (0.3)	39.3 (0.3)	39.3 (0.4)	39.2 (0.3)	39.6 (0.4)	39.3 (0.2)	39.1 (0.3)	39.1 (0.4)	39.1 (0.1)	39.0 (0.2)	39.2 (0.2)	39.0 (0.3)	39.6 (0.3)	39.3 (0.2)	39.1 (0.4)	39.3 (0.3)	39.0 (0.5)	38.9 (0.3)	39.2 (0.3)	39.0 (0.3)	
2	38.8 (0.4)	39.1 (0.7)	40.3* (0.1)	39.8* (0.3)	39.7* (0.4)	39.6* (0.4)	39.9 (0.1)	39.5 (0.3)	39.3 (0.2)	39.3 (0.2)	39.2 (0.1)	39.2 (0.2)	39.4* (0.1)	389 (0.3)	39.6 (0.4)	39.3 (0.3)	39.2 (0.3)	39.3 (0.3)	39.2 (0.3)	39.2 (0.2)	39.1 (0.2)	39.6* (0.2)	39.5* (0.2)
3	38.4 (0.4)	39.3 (0.3)	40.1* (0.3)	39.8* (0.5)	39.1 (0.3)	39.7* (0.3)	39.6 (0.2)	39.2 (0.2)	39.2 (0.3)	39.0 (0.1)	39.2 (0.2)	39.6* (0.3)	39.5* (0.3)	39.2* (0.2)	39.3 (0.3)	39.3 (0.2)	39.3 (0.2)	39.3 (0.5)	39.3 (0.3)	39.4* (0.3)	39.2 (0.3)	39.4 (0.2)	39.6* (0.2)

\* Significativamente maior do que o grupo 1 (P<0.05)

Grupo 1 Cães vacinados, Grupo 2 Cães de controle selecionados da mesma fonte ao mesmo tempo, Grupo 3 filhotes de controle de 10 semanas de idade da mesma fonte

**TABELA 5: Escores clínicos médios (dp) dos três grupos de cães depois de terem sido submetidos à provocação com *Bordetella bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina 56 semanas depois de o grupo 1 ter sido vacinado**

Grupo	Dia depois da provocação																				Total		
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		20	21
1	0·1 (0·3)	0·3 (0·5)	0·2 (0·4)	0·3 (0·5)	0·4 (0·5)	0·3 (0·5)	1·7 (1·1)	0·3 (0·5)	0	0·1 (0·3)	0	0·1 (0·3)	0·1 (0·3)	00 (0·0)	07 (07)	0·3 (0·5)	07 (0·6)	0·3 (00)	0·3 (0·6)	0	0·3 (0·6)	0	58 (3·2)
2	0	07 (1·8)	20 (0·8)	20 (1·4)	10 (1·0)	10 (0·6)	10 (0·8)	07 (0·8)	0·3 (0·8)	07 (0·4)	07 (0·4)	0	07 (0·4)	00 (0·5)	10 (0·9)	00 (0·5)	00 (0·8)	07 (0·4)	00 (0·0)	0	07 (00)	07 (00)	14·8* (6·2)
3	0	10 (0·9)	70 (2·3)	80 (2·1)	50 (1·5)	57 (2·3)	60 (1·5)	17 (0·4)	10 (0·9)	17 (1·2)	10 (1·2)	2·1 (3·4)	20 (1·5)	17 (1·2)	17 (1·8)	20 (1·4)	00 (0·4)	10 (1·2)	10 (1·2)	1·3 (1·0)	20 (0·6)	10 (0·6)	56·8** (8·6)

\* Significativamente maior do que o grupo 1 (P=0·009)

\*\* P=0·001

Grupo 1 Cães vacinados, Grupo 2 Cães de controle selecionados da mesma fonte ao mesmo tempo, Grupo 3 filhotes de controle de 10 semanas de idade da mesma fonte

**Isolamento de vírus da parainfluenza canina**

Depois da provocação, todos os cães do grupo 2 e os filhotes do grupo 3 se tornaram infectados com o vírus da parainfluenza canina, que pode ser reisolado por até uma semana depois da provocação. Ao contrário, apenas poucos dos cães vacinados do grupo 1 se tornaram infectados temporariamente, por um dia (Tabela 7). A diferença entre o grupo vacinado e os grupos de controle foi significativa (P<0·05, teste de Mann-Whitney U).

**DISCUSSÃO**

Todos os cães do grupo 1 eram negativos para *B bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina por sorologia e isolamento antes de serem vacinados, e os cães de controle do grupo 2 permaneceram negativos para ambos os organismos até que fossem submetidos à provocação. Este resultado sugere que nenhum dos cães vacinados foi exposto a uma infecção de campo e, portanto, que a proteção demonstrada foi totalmente o resultado da vacinação.

A vacinação induziu títulos de anticorpos neutralizantes séricos contra o vírus da parainfluenza canina em todos os cães vacinados, títulos que ainda eram detectáveis 56 semanas depois da vacinação. Esses títulos indicam que houve uma resposta imune à vacina, mas, para o conhecimento dos autores, não houve correlação clara entre o título de anticorpo circulante para o vírus da parainfluenza canina e o nível de proteção.

A vacinação também induziu títulos de anticorpos do ELISA moderados contra *B bronchiseptica*, embora quatro dos cães permanecessem soronegativos. Achados semelhantes foram relatados em outros estudos com vacinas vivas modificadas para administração por via mucosa (Bemis e outros 1977b). Acredita-se que a proteção oferecida por essas vacinas mucosas seja principalmente devida à imunoglobulina A mucosa ao invés de ao anticorpo sérico (Bey e outros 1981).

Os filhotes de controle do grupo 3 também foram negativos para ambos os organismos quando foram submetidos à provocação. Os sinais clínicos nesses filhotes foram mais graves do que aqueles dos cães de controle do grupo 2, e números maiores de *B bronchiseptica* foram isolados deles, provavelmente porque a resistência a uma provocação com *B bronchiseptica* nesse modelo aumenta com a idade. O escore clínico médio dos cães vacinados foi 61 por cento menor do que aquele dos cães de controle do grupo 2, e 90 por cento menor do que aquele dos filhotes de controle do grupo 3. Esse nível de proteção é semelhante àquele observado em um estudo no qual os cães foram submetidos à provocação 72 horas depois de serem vacinados com a mesma vacina (Hendriks e Peters 1999). Naquele estudo, os sinais clínicos foram reduzidos até 82 por cento. Assim, a vacina utilizada no presente estudo induziu imunidade que durou por pelo menos 56 semanas e proporcionou proteção quase completa em 56 semanas. Uma vacinação anual com essa vacina intranasal viva bivalente, modificada, deve, portanto, proporcionar ao cães proteção contínua contra traqueobronquite infecciosa.

Demonstrou-se que cães podem transmitir o vírus da parainfluenza canina por um período de aproximadamente duas semanas depois de serem infectados (Appel e Binn 1987). No presente estudo, os cães de controle não vacinados disseminaram o vírus da parainfluenza canina por aproximadamente uma semana depois de serem submetidos à provocação ao passo que os cães vacinados disseminaram quase nenhum vírus.

Estudos semelhantes mostraram que *B bronchiseptica* pode ser transmitida por períodos de até três meses após a infecção (Appel e Binn 1987). No presente estudo, todos os filhotes de controle do grupo 3 ainda estavam disseminando *B bronchiseptica* 20 dias depois de terem sido submetidos à provocação, ao passo que a maioria dos cães de controle do grupo 2 disseminaram *B bronchiseptica* por apenas até nove dias. Houve uma redução significativa na disseminação de *B bronchiseptica* pelos cães vacinados em comparação com os cães de controle do grupo 2 somente dois dias depois da provocação, ao passo que houve uma redução significativa em comparação com os filhotes de controle do grupo 3 ao longo do período de observação. Assim, a revacinação anual com essa vacina deve não apenas proteger os cães contra os sinais clínicos, mas, também pode ajudar a prevenir a disseminação da infecção para outros cães.

**TABELA 6: Títulos médios (dp) de *Bordetella bronchiseptica* (log<sub>10</sub> unidades formadoras de colônia/ml) isolados de swabs nasais coletados dos três grupos de cães submetidos à provocação com *B bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina 56 semanas depois que o grupo 1 havia sido vacinado**

Grupo	Dia depois da provocação						
	0	2	6	9	13	16	20
1	0	1·1 (1·3)	0·5 (0·7)	02 (0·4)	0	0	0
2	0	3·0* (1·5)	1·3 (1·1)	0·5 (0·8)	0	0	0
3	0	5·4* (1·1)	4·5* (0·6)	4·5* (0·6)	4·6* (1·0)	4·7* (0·6)	5·7* (0·8)

\* Significativamente maior do que o grupo 1 (P<0·05)

Grupo 1 Cães vacinados, Grupo 2 Cães de controle selecionados da mesma fonte ao mesmo tempo, Grupo 3 filhotes de controle de 10 semanas de idade da mesma fonte

**TABELA 7: Títulos médios (dp) de vírus da parainfluenza canina (log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) isolados de swabs nasais coletados dos três grupos de cães submetidos à provocação com *Bordetella bronchiseptica* e vírus da parainfluenza canina 56 semanas depois que o grupo 1 havia sido vacinado**

Grupo	Dia depois da provocação										
	0	2	3	4	5	6	7	8	10	15	21
1	0	<0·3 (0·5)	<0·6 (1·0)	0·5 (1·0)	<0·1 (0·3)	<0·1 (0·3)	0	0	0	0	0
2	0	4·0* (0·7)	4·3* (0·6)	4·4* (0·4)	3·5* (0·5)	2·3* (0·6)	<0·6 (00)	07 (00)	0	0	0
3	0	4·1* (1·4)	4·1* (0·5)	4·9* (0·4)	4·4* (0·8)	2·6* (0·9)	<1·7* (1·3)	0	0	0	0

\* Significativamente maior do que o grupo 1 (P<0·05)

Grupo 1 Cães vacinados, Grupo 2 Cães de controle selecionados da mesma fonte ao mesmo tempo, Grupo 3 filhotes de controle de 10 semanas de idade da mesma fonte

**Referências**

- APPEL, M. & BINN, L. N. (1987) Canine infectious tracheobronchitis short review: kennel cough. In *Virus Infections of Vertebrates*. Vol 1, Virus Infections of Carnivores. Ed M. Horzinek. Amsterdam, Elsevier. pp 2012-11
- BEMIS, D. A., CARMICHAEL, L. E. & APPEL, M. J. G. (1977a) Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Veterinarian* **67**,282-293
- BEMIS, D. A., GREISEN, H. A. & APPEL, M. J. G. (1977b) Pathogenesis in canine bordetellosis. *Journal of Infectious Diseases* **135**,753-762
- BEY, R. F., SHADE, F. J., GOODNOW, R. A. & JOHNSON, R. C. (1981) Intranasal vaccination of dogs with live avirulent *Bordetella bronchiseptica*: a correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally-induced infectious tracheobronchitis. *American Journal of Veterinary Research* **42**,1131-1132
- FORD, R. B. & VADEN, S. (1998) Canine infectious laryngotracheitis. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2nd edn. Ed C. E. Greene. Philadelphia, W. B. Saunders. pp 33-38
- HENDRIKS, S. D. & PETERS, J. (1999) Onset of immunity for a vaccine against *Bordetella*. Voorjaarsdagen Congress Proceedings 1999. Amsterdam, The Netherlands, April 23 to 25, 1999. pp 52-53
- JACOBS, A. A. C., CHALMERS, W. S. K., PASMAN, J., VAN VUGT, F. & CUENE, L. H. (1993) Feline bordetellosis: challenge and vaccine studies. *Veterinary Record* **133**,260-263
- KONTOR, E. J., WEGRZYN, R. J. & GOODNOW, R. A. (1981) Canine infectious tracheobronchitis: effects of an intranasal live canine parainfluenza *Bordetella bronchiseptica* vaccine on viral shedding and clinical tracheobronchitis (kennel cough). *American Journal of Veterinary Research* **42**,1694-1698
- MCCANDLISH, I. A. P., THOMPSON, H., CORNWELL, H. J. C. & WRIGHT, N. G. (1978) A study of dogs with kennel cough. *Veterinary Record* **102**,298301
- TISCHLER, S. A. & HILL, J. R. (1977) Kennel cough syndrome in a pet store. *Journal of the American Animal Hospital Association* **13**,342-348