

Comparação da Resposta Imune Mucosa em Cães Vacinados com uma Cultura Viva Avirulenta Intranasal ou uma Vacina de Extrato Antigênico Subcutânea de *Bordetella bronchiseptica* *

Randy Davis, BS

Huchappa Jayappa, MVSc, PhD

Omar Y. Abdelmagid, BVSc, MS, PhD

Rob Armstrong, DVM, DVSc

Diane Sweeney, PhD

Craig Lehr, BS

Schering-Plough Animal Health

21401 West Center Road

Elkhorn, NE 68022

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Cães saudáveis com título de anticorpos baixo para *Bordetella bronchiseptica* foram vacinados por via intranasal com uma vacina viva avirulenta, por via subcutânea com uma vacina de extrato antigênico, ou por via subcutânea e por via intranasal com placebo. Os cães vacinados por via intranasal desenvolveram títulos de IgA específicos de *B. bronchiseptica* nas secreções nasais que permaneceram com níveis elevados até o fim do estudo; os cães vacinados por via subcutânea com o extrato antigênico ou placebo não desenvolveram títulos de IgA específicos do antígeno mensuráveis nas secreções nasais. Os cães foram submetidos à provocação com *B. bronchiseptica* viva, virulenta, 63 dias depois da vacinação. Os cães vacinados por via intranasal apresentaram escores de tosse significativamente menores ($P \leq 0,0058$) e disseminaram significativamente menos organismos de provocação ($P < 0,0001$) do que os cães em quaisquer dos outros grupos. Os escores de tosse de cães vacinados por via subcutânea não foram significativamente diferentes dos cães vacinados com placebo.

INTRODUÇÃO

A bronquite traqueal canina infecciosa (também conhecida como tosse canina ou tosse do canil) é uma doença respiratória superior comum de cães. Ela pode ocorrer como resultado de infecção por *Bordetella bronchiseptica* apenas, mas é mais frequentemente uma doença complexa envolvendo infecção respiratória superior com vários patógenos potenciais.¹ No entanto, *B. bronchiseptica* é considerada como sendo uma causa comum de infecções

respiratórias superiores caninas,² e a vacinação para induzir proteção contra esse organismo é uma base na prevenção de bronquite traqueal canina infecciosa.³ Atualmente, os veterinários nos Estados Unidos podem selecionar duas abordagens gerais ao imunizar cães contra esse organismo específico: uma cultura viva avirulenta inoculada por via intranasal ou uma vacina de extrato antigênico administrada por via subcutânea.

*Esta pesquisa foi financiada pela Schering-Plough Animal Health Corp., Elkhorn, NE. Correspondências devem ser enviadas para o Dr. Abdelmagid.

A imunidade local é considerada como sendo de importância primária ao proporcionar proteção contra infecções por *B. bronchiseptica*⁴ e outros patógenos respiratórios superiores, e acredita-se que a vacinação por via intranasal seja mais eficiente na indução de imunidade mucosa local. Por exemplo, a vacinação por via intranasal com uma cultura viva avirulenta induziu proteção clínica detectável contra a provocação com *B. bronchiseptica* virulenta tão cedo quanto 48 horas após a administração em cães.⁵ Esse estudo também relatou evidência de imunofluorescência indireta de IgA secretora específica de *B. bronchiseptica* no dia 4 pós-vacinação. Além disso, a vacinação intranasal contra um patógeno respiratório superior canino diferente, o vírus da parainfluenza canina, com uma vacina de vírus vivo modificado demonstrou reduzir a disseminação do vírus pós-provocação em comparação com a vacinação por via subcutânea ou intramuscular.⁶

Ao contrário, dois outros estudos^{7,8} levantam questões com relação à eficácia comparativa de vacinas administradas por via intranasal e parenteral (intramuscular em um estudo⁷ e subcutânea no outro⁸) contra *B. bronchiseptica* em cães. Um estudo⁷ não encontrou diferença significativa nos sinais clínicos nos dias 4 a 10 pós-provocação entre os filhotes vacinados 14 dias antes com uma bacterina de *B. bronchiseptica* viva avirulenta intranasal ou uma bacterina de *B. bronchiseptica* administrada por via intramuscular. O outro estudo⁸ relatou que a vacinação por via intranasal de cães soropositivos para *B. bronchiseptica* induziu uma resposta de IgG sérica significativamente menor do que a vacinação com uma bacterina de *B. bronchiseptica* administrada por via subcutânea.⁸

O outro estudo também relatou que cães tratados com a vacina subcutânea apresentaram níveis séricos de IgA significativamente maiores do que cães tratados com uma vacina intranasal; a significância desse achado não é clara porque se acredita que as concentrações séricas de IgA são indicadores insatisfatórios de secreção mucosa⁹ e considera-se que a IgA tenha evoluído principalmente para proteger as superfícies

corporais.¹⁰

Quando administradas por via intranasal, espera-se que as vacinas vivas avirulentas colonizem a mucosa nasal, o que poderia resultar no estímulo da resposta da IgA mucosa. A relação entre a administração por via intranasal de uma vacina viva e a administração por via parenteral de uma vacina inativada na indução da resposta da IgA e proteção não foi claramente estabelecida em um estudo controlado. Portanto, o estudo relatado aqui foi desenhado para avaliar se uma vacina viva avirulenta administrada pela via intranasal induz uma resposta da IgA humoral e mucosa em comparação com uma vacina inativada administrada pela via parenteral. Um objetivo adicional desse estudo era avaliar se existe qualquer correlação entre proteção e a resposta da IgA mucosa.

■ MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Vacinas

Trinta e cinco filhotes de Beagle saudáveis de 9 a 10 semanas de idade sem histórico de vacinação contra *B. bronchiseptica* e com um baixo nível de anticorpos contra este organismo em um teste de aglutinação sérica foram designados aleatoriamente para um de três grupos. Um *swab* nasal e uma amostra de lavagem nasal foram coletados de cada cão antes da vacinação. Os cães de cada grupo foram, então, vacinados no dia 0 com um dos produtos a seguir:

- Uma vacina intranasal trivalente viva modificada (Intra-Trac 3, Schering-Plough Animal Health; número de série 54119; data de validade: 04 de fevereiro de 2007) contendo cultura de *B. bronchiseptica* viva avirulenta, vírus da parainfluenza canina viva modificada e adenovírus canino tipo 2 vivo modificado
- Uma vacina morta, subcutânea, de extrato antigênico (Bronchicine CAe; Pfizer Animal Health; número de série B570229A; data de validade: 18 de abril de 2007), seguida por uma segunda vacinação 21 dias depois conforme recomendado na bula do produto
- Um placebo de solução salina administrado tanto por via intranasal quanto subcutânea

Ninguém encarregado por fazer observações clínicas tinha qualquer conhecimento das designações do grupo de tratamento. Todos os cães foram tratados de acordo com um protocolo aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso Animal.

Medição da IgA Mucosa

Amostras de lavagem nasal foram coletadas de cada filhote 5 dias antes da vacinação (dia -5) e nos dias 14, 21, 28, 42 e 56 após a vacinação. Essas amostras foram coletadas conforme determinado pelo ELISA indireto. Em resumo, diluições de duas vezes do líquido da lavagem foram adicionadas a uma placa de microtítulo revestida com antígeno de *B. bronchiseptica* lavado, sonicado. Depois da lavagem, a placa foi incubada com IgA

anticanina conjugada com peroxidase e substrato de coloração foi adicionado. A reação foi interrompida e a densidade ótica lida a 450 nm. O título foi determinado com base na recíproca da diluição mais elevada mostrando densidade ótica acima da referência e, então, normalizado com base na resposta de uma amostra de lavagem nasal de controle positivo em cada placa.

Medição do Anticorpo Sérico

Amostras de soro foram coletadas de todos os cães do estudo nos dias 0 (antes da vacinação), 28, 42, 62 e 84 (a última amostra foi coletada 21 dias depois da provocação) para medição de títulos séricos heterólogos de *B. bronchiseptica*.

Os cães vacinados por via intranasal desenvolveram uma resposta da IgA mucosa específica de B. bronchiseptica.

Diluições em série de duas vezes de soro do teste, juntamente com soro positivo e negativo conhecido foram administrando anestesia leve em cada cão; então, com o cão em recumbência esternal, um cateter de borracha flexível foi introduzido na cavidade nasal e 5,0 ml de solução salina normal estéril morna foram aplicados na cavidade nasal e o efluente coletado. As amostras foram centrifugadas (2.500 Xg a 2 °C a 10 °C por 10 minutos) e o sobrenadante foi coletado. Conservantes foram adicionados para alcançar uma concentração final de 0,01% de timerosal e menos de 0,25 mg/ml de gentamicina, e as amostras foram dispersadas em alíquotas de 0,2 a 1,0 ml e congeladas a -50 °C ou menos até o teste. No teste, títulos de anticorpos IgA para a cepa

heteróloga D-2 de *B. bronchiseptica* produzida em uma placa de microtítulo com fundo em U; 0,1 ml de antígeno heterólogo de *B. bronchiseptica* foi adicionado em cada poço e misturado por 15 a 30 segundos em um agitador de placas de microtítulo. As placas foram incubadas a 36 °C (\pm 2 °C) por 2 a 4 horas, armazenadas por 36 a 72 horas a 20 °C a 28 °C, e lidas visualmente em um suporte de espelho quanto à aglutinação. O título é expresso como o recíproco da maior diluição mostrando aglutinação completa.

Provocação

Todos os cães foram submetidos à provocação por via intranasal com 1,0 ml de uma cultura de *B. bronchiseptica* viva virulenta (cepa D-2) no dia 63 depois da vacinação.

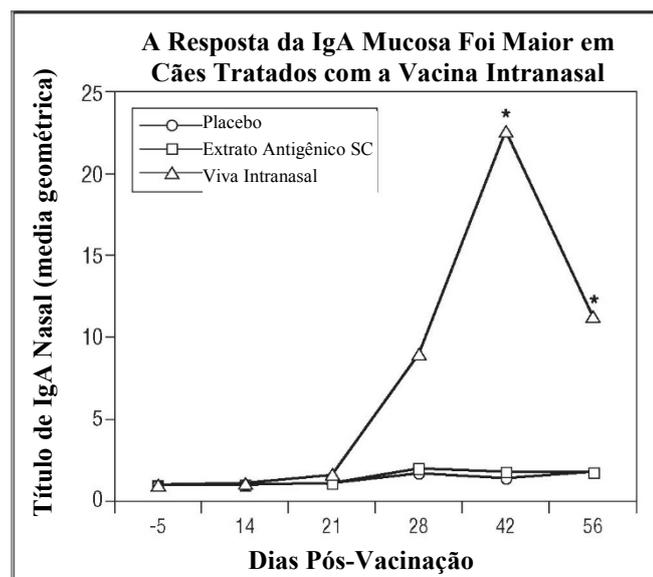


Figura 1. Anticorpo IgA específico de *B. bronchiseptica* em secreções nasais de cães vacinados com uma vacina viva avirulenta intranasal, de extrato antigênico subcutâneo ou de placebo. *Asteriscos indicam uma diferença significativa no grupo tratado por via intranasal em comparação com o grupo tratado com a vacina de placebo ou de extrato antigênico.

Observação Clínica

Os cães foram observados antes da provocação, no dia da provocação e, então, diariamente por 21 dias, com observações clínicas feitas no mesmo horário a cada dia. Cada cão foi observado e um escore de tosse foi atribuído, como segue:

- 0 = Sem tosse
- 1 = Tosse induzida com palpação traqueal suave
- 2 = Tosse espontânea ou frequente
- 3 = Tosse espontânea ou frequente com regurgitação

Coleta de Swab Nasal para Isolamento Bacteriano

Swabs nasais foram coletados de ambas as narinas de cada cão nos dias 3, 7, 10, 14, 17 e 21 pós-provocação utilizando swabs de cultura de alginato de cálcio disponíveis comercialmente e meios de transporte. Os swabs eram congelados imediatamente em gelo seco e armazenados a -50°C ou menos até a realização do teste de isolamento. Os swabs nasais descongelados eram diluídos em série 10 vezes em caldo triptose

fosfato em colocados em placas em ágar MacConkey (com nitrofurantoina), então, incubados a 36°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) por 24 a 72 horas. As colônias bacterianas resultadas foram contadas para determinar a UFC/ml.

Análise Estatística

Os escores de tosse clínica e a disseminação bacteriana foram comparados estatisticamente utilizando testes de soma de postos de Wilcoxon para comparações pareadas e o teste de Kruskal-Wallis para comparações gerais. A sorologia foi analisada utilizando-se valores de \log_2 . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SAS (versão 8.2, SAS Institute, Cary, NC). A significância estatística foi declarada para valores de $P < 0,05$.

■ RESULTADOS

Os cães vacinados por via intranasal com uma cultura avirulenta viva modificada desenvolveram resposta de IgA mucosa específica de *B. bronchiseptica* significativamente maior ao antígeno heterólogo (Figura 1) que persistiu pela duração do estudo. A resposta da IgA mucosa nas secreções nasais foi significativamente maior no grupo vacinado por via intranasal do que a vacina de extrato antigênico ou placebo nos dias 42 e 56 ($P < 0,0002$). Os cães vacinados com a vacina de extrato antigênico ou placebo falharam em desenvolver um aumento mensurável dos níveis de IgA de *B. bronchiseptica* em sua mucosa nasal, e não houve diferenças significativas entre esses dois grupos em qualquer ponto de tempo.

Os cães que receberam a vacinação por via intranasal também desenvolveram um aumento significativo ($P < 0,0001$) no título de anticorpos séricos contra uma cepa heteróloga de *B. bronchiseptica* após a vacinação, a passo que os cães vacinados com extrato antigênico e placebo não apresentaram mudança no título sérico (Figura 2) até depois que a provocação foi administrada no dia 63.

Os escores médios de tosse pós-provocação (Figura 3) foram significativamente menores (isto é, a tosse foi menos grave) no grupo vacinado com a vacina viva avirulenta intranasal em comparação com os grupos tratados com a vacina de extrato antigênico ($P =$

0,0009) ou placebo ($P = 0,0058$). Os escores de tosse nos cães vacinados com extrato antigênico não foram significativamente diferentes dos escores do grupo tratado com placebo ($P = 0,5120$). A proporção de cães que apresentaram os maiores escores de tosse (tosse frequente e/ou tosse com regurgitação [escore ≥ 2]) foi de 8,3% para cães vacinados por via intranasal, 63,6% para cães vacinados com extrato antigênico, e de 58,3% para cães vacinados com placebo. O total de dias de tosse (Figura 4) também foi significativamente menor para o grupo tratado com a vacina intranasal (média: 1,3 dia) em comparação com o grupo vacinado com extrato antigênico (média: 5,9 dias; $P = 0,0016$) ou com placebo (média: 4,8 dias; $P = 0,0090$). Não houve diferenças significativas entre os grupos vacinados com placebo e extrato antigênico ($P = 0,4370$).

Os cães vacinados com a vacina intranasal disseminaram significativamente menos organismos após a provocação em comparação com os outros grupos, com apenas quatro cães (33%) disseminando níveis baixos ($<10^2$ UFC/ml) de bactérias em amostras de *swab* nasal em um ponto de tempo cada, e apresentaram uma disseminação média geométrica significativamente menor em UFC/ml (Figura 5) em comparação com os outros dois grupos ($P < 0,0001$). Todos os cães do grupo vacinado com extrato antigênico e 11 de 12 (92%) cães vacinados com placebo disseminaram organismos *B. bronchiseptica* em um ou mais pontos de tempo depois da provocação, com o maior número de organismos (10^5 UFC/ml) detectado em um cão vacinado com extrato antigênico administrado por via subcutânea 21 dias após a provocação.

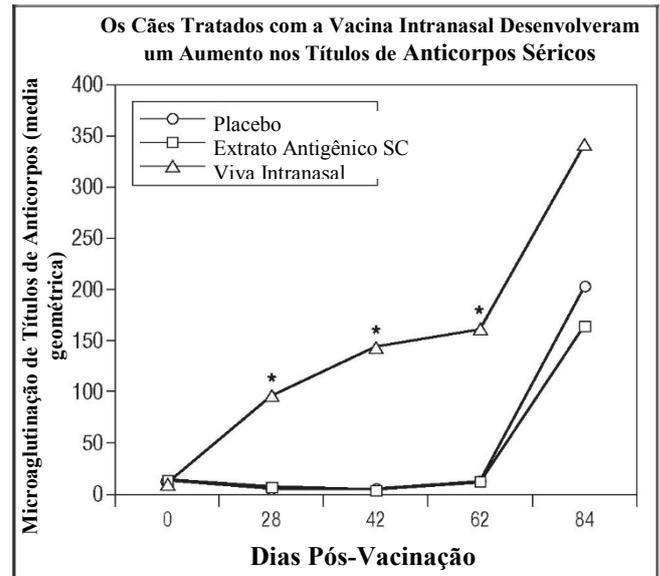


Figura 2. Anticorpos séricos de *B. bronchiseptica* em cães vacinados com uma vacina viva avirulenta intranasal, de extrato antigênico subcutâneo ou de placebo. *Asteriscos indicam uma diferença significativa no grupo tratado por via intranasal em comparação com o grupo tratado com a vacina de placebo ou de extrato antigênico.

■ DISCUSSÃO

Esses resultados mostram que a vacinação intranasal de cães com *B. bronchiseptica* viva, avirulenta, leva à produção de um nível significativamente mais elevado de imunoglobulinas IgA mucosas específicas do antígeno em comparação com a vacinação com a vacina de extrato antigênico injetada por via subcutânea. Além disso, a vacinação intranasal oferece proteção significativa contra a provocação em comparação com a vacinação com uma vacina de extrato antigênico administrada por via subcutânea, conforme mostram os escores de tosse significativamente menores, menos dias de tosse, e menos disseminação bacteriana após a provocação por via intranasal com uma cultura virulenta de *B. bronchiseptica*. Esses resultados sugerem que existe boa correlação entre a IgA específica de *Bordetella* nas secreções nasais e a proteção contra a provocação com esse organismo. Este achado é consistente com o papel documentado da IgA mucosa em proporcionar proteção contra patógenos respiratórios de superfície.¹¹

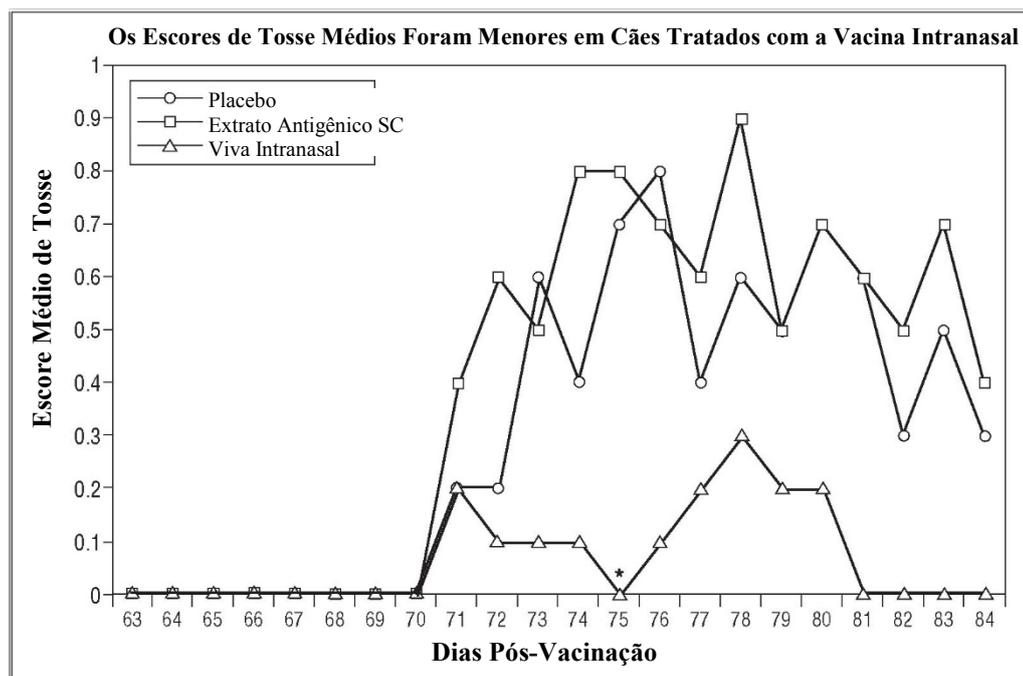


Figura 3. Escores de tosse médios após provocação com *B. bronchiseptica virulenta*. *O asterisco indica uma diferença significativa no grupo tratado por via intranasal em comparação com o grupo tratado com a vacina de placebo ou de extrato antigênico.

Os níveis de IgA específica do antígeno foram medidos nas secreções nasais caninas utilizando uma técnica de ELISA desenvolvida e validada para este estudo. No entanto, um estudo anterior⁵ utilizando um ensaio de imunofluorescência detectou IgA específico do antígeno 4 dias depois da vacinação intranasal em cães. A detecção prematura de IgA específica pode ter ocorrido porque os cães do estudo anterior apresentaram títulos de secreção nasal maiores como uma consequência da exposição anterior à *B. bronchiseptica*. Um estudo adicional está em andamento para avaliar o tempo de detecção do anticorpo na secreção nasal em cães vacinados por via intranasal com antígenos disponíveis em outras vacinas intranasais vivas avirulentas comercialmente disponíveis nos Estados Unidos.

Um estudo anterior⁵ relatou que cães poderiam ser protegidos tão cedo quanto 48 horas depois da vacinação por via intranasal, sugerindo que a proteção contra a provocação pode ocorrer mais cedo do que o início da resposta imunológica adaptativa mensurável observada nesse estudo. Isso pode indicar que a indução de mecanismos de proteção não

específicos é responsável pelo início prematuro da proteção após a vacinação por via intranasal; no entanto, o presente estudo não foi desenhado para determinar o tempo do início da imunidade. Evidência do rápido desenvolvimento de mecanismos protetores não específicos após a vacinação por via intranasal foi observada em associação com a vacinação contra a influenza atenuada viva de humanos, conforme mostra um aumento pós-vacinal significativo na produção de interferon- γ ,¹² uma citocina que se acredita que tenha um papel importante como a primeira linha de defesa contra a infecção por influenza.¹³

A vacinação por via subcutânea de cães com duas doses de um extrato antigênico falhou em induzir o anticorpo mucoso nas secreções nasais ou um título de anticorpo no soro (Figuras 1 e 2). O motivo dessa falha é desconhecido, muito embora seja provavelmente o resultado de interferência do anticorpo materno porque os cães desse estudo apresentaram baixo título de *B. bronchiseptica* antes da vacinação e uma vacinação de reforço foi administrada 3 semanas depois da imunização inicial. No entanto, a falta de resposta do anticorpo específico é consistente com a observação de que cães vacinados por via

subcutânea não estavam protegidos contra infecção por *B. bronchiseptica* porque eles não se saíram melhor depois da provocação do que os cães vacinados com placebo conforme medido pelos escores de tosse pós-provocação. A falta de proteção observada é um suporte adicional para os papéis imunológicos da IgA mucosa de proteção do trato respiratório superior canino contra infecção e doença causadas por patógenos mucosos de superfície.¹³ O valor protetor da vacina de extrato antigênico administrada por via subcutânea não pode ser demonstrado durante este estudo. A imunização parenteral tem sido geralmente considerada como ineficaz para elicitar uma resposta secretora de IgA.¹⁴ É necessário um trabalho adicional para avaliar a resposta mucosa após a vacinação parenteral em animais previamente imunizados.

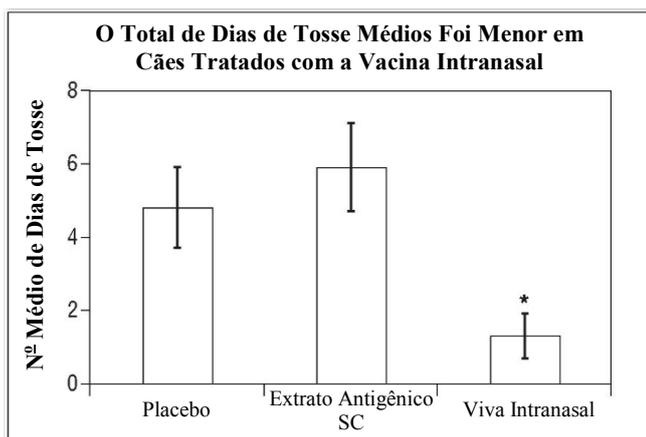


Figura 4. Número médio de dias de tosse após a provocação com *B. bronchiseptica* virulenta. *O asterisco indica uma diferença significativa no grupo tratado por via intranasal em comparação com o grupo tratado com a vacina de placebo ou de extrato antigênico.

Os resultados deste estudo não são consistentes com os dados relatados em duas investigações anteriores^{7,8} que compararam a imunidade contra *B. bronchiseptica* induzida por uma vacina intranasal ou injetável. No entanto, esses estudos anteriores utilizaram uma vacina bacterina (CoughGuard, Pfizer Animal Health; não mais disponível comercialmente nos Estados Unidos) que, provavelmente, apresenta diferenças significativas de formulação. Adicionalmente, um desses estudos⁷ utilizou uma via de administração intramuscular que

pode ter afetado os resultados, ao passo que a vacina de extrato antigênico utilizada neste estudo é rotulada apenas para administração por via subcutânea.

Os estudos anteriores^{7,8} comparando a vacinação intranasal e a bacterina de cães encontrou efeitos inconsistentes de administração dessas vacinas na IgA salivar reativa à *B. bronchiseptica* (os níveis de IgA mucosa nasais não foram avaliados). Um estudo⁸ não encontrou diferenças significativas na IgA salivar ao longo do tempo ou entre os grupos após a vacinação de cães anteriormente expostos à *B. bronchiseptica*; no entanto, o outro estudo⁷ encontrou concentrações de IgA salivar significativamente maiores após a vacinação com bacterina intramuscular ou a vacinação intranasal. A significância de níveis de IgA salivar para proteção não está clara; considerando a evidência da compartimentação das respostas imunes mucosas,¹⁵ é provável que os níveis de IgA salivar não estejam correlacionados com os níveis de IgA nas secreções nasais.

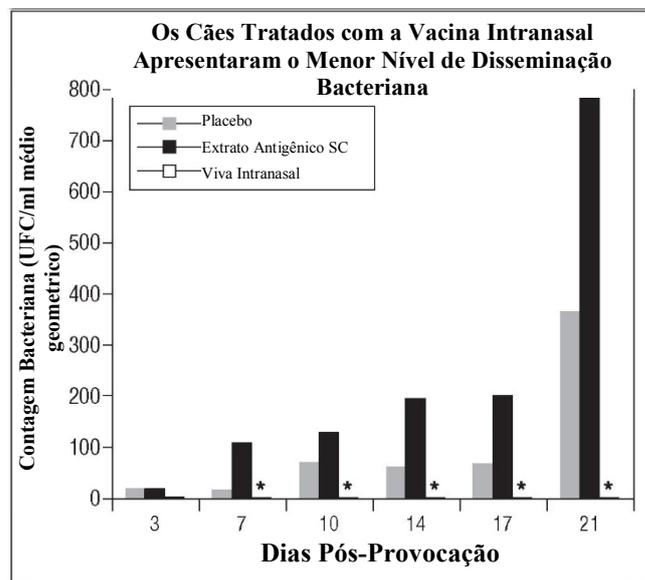


Figura 5. Disseminação de organismos da provocação nas secreções nasais após a provocação com *B. bronchiseptica* virulenta. *Asteriscos indicam uma diferença significativa no grupo tratado por via intranasal em comparação com o grupo tratado com a vacina de placebo ou de extrato antigênico.

Os dados do presente estudo não avaliam a duração da imunidade após a vacinação ou os

efeitos imunológicos da administração da vacina intranasal em cães previamente expostos. Este estudo mostra, no entanto, que:

- A vacinação intranasal induziu níveis elevados de IgA específica do antígeno nas secreções nasais
- Os níveis de IgA em cães vacinados por via intranasal permaneceram elevados por pelo menos 56 dias após a vacinação (Figura 1), o último ponto de amostragem deste estudo.
- A vacinação intranasal proporcionou boa proteção contra a provocação 63 dias depois da vacinação.

O presente estudo mostrou que os cães submetidos à provocação após a vacinação intranasal apresentaram disseminação significativamente menor de bactérias da provocação após a provocação (Figura 5; $P < 0,0001$) em comparação com a disseminação bacteriana de cães que receberam a vacina de extrato antigênico subcutânea. Este achado é consistente com os estudos publicados anteriores comparando o nível de disseminação viral após a provocação em cães vacinados com uma vacina contra o vírus da parainfluenza canina vivo, avirulenta, intranasal ou injetável.⁶ É provável que o mecanismo esteja associado com o aumento dos níveis de imunoglobulinas específicas do antígeno mucoso nasal prevenindo a colonização e a replicação do patógeno. É provável que a colonização bacteriana e a subsequente disseminação sejam um fator importante na propagação de um surto de doença de traqueobronquite infecciosa canina, e recomenda-se que os animais afetados sejam isolados.³ Portanto, a vacinação intranasal parece oferecer um benefício maior no controle do surto reduzindo a disseminação e, subsequentemente, reduzindo o risco de exposição para animais suscetíveis.

■ CONCLUSÃO

Este estudo apresenta evidência clara de que a vacinação intranasal com uma cultura viva avirulenta de *B. bronchiseptica* proporciona uma resposta imune local específica que é significativamente mais eficaz na indução de proteção contra a provocação com organismos virulentos do que a vacinação por via subcutânea com uma vacina de extrato antigênico.

■ REFERÊNCIAS

1. Bemis DA: *Bordetella* and *Mycoplasma* respiratory infections in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Bract* 22(5):1173-1186, 1992.
2. Datz C: *Bordetella* infections in dogs and cats: Pathogenesis, clinical signs and diagnosis. *Compend Contin Educ Pract Vet* 25(12):896-901, 2003
3. Datz C: *Bordetella* infections in dogs and cats: Treatment and prevention. *Compend Contin Educ Pract Vet* 25(12):902-914, 2003.
4. Bemis DA, Greisen HA, Appel MJG: Pathogenesis of canine bordetellosis. *J Infect Dis* 135(5):753-762, 1977.
5. Bey RF, Shade FJ, Goodnow RA, Johnson RC: Intranasal vaccination of dogs with live avirulent *Bordetella bronchiseptica*: Correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis. *Am J Vet Res* 42:1130-1132, 1981.
6. Kontor EJ, Wegrzyn MA, Goodnow RA: Canine infectious tracheobronchitis: Effects of an intranasal live canine parainfluenza-*Bordetella bronchiseptica* vaccine on viral shedding and clinical tracheobronchitis (kennel cough). *Am J Vet Res* 42:1694-1698, 1981.
7. Ellis JA, Haines DM, West KH, et al: Effect of vaccination on experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *JAVMA* 218(3):367-375, 2001.
8. Ellis JA, Krakowka GS, Dayton AD, Konoby C: Comparative efficacy of an injectable vaccine and an intranasal vaccine in stimulating *Bordetella bronchiseptica*-reactive antibody responses in seropositive dogs. *JAVMA* 220(1):43-48, 2002.
9. German AJ, Hall EJ, Day MJ: Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. *Vet Immunol Immunopathol* 64:107121, 1998.
10. Tizard IR: *Veterinary Immunology: An Introduction*. Philadelphia, WB Saunders,

- 1996, p 256.
11. Tizard IR: *Veterinary Immunology: An Introduction*. Philadelphia, WB Saunders, 1996, p 262.
 12. Tomoda T, Morita H, Kurashige T, Maassab HF: Prevention of influenza by the intranasal administration of cold-recombinant, live-attenuated influenza virus vaccine: Importance of interferon- γ production and local IgA response. *Vaccine* 13(2):185-190, 1995.
 13. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, ed 4. London, Garland Publishing, 1999, pp 326-327.
 14. Cárdenas-Freytag L, Cheng E, Mirza A: New approaches to mucosal immunization, in Paul PS, Francis DH (eds): *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases 2*. NewYork, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999, pp 319-337.
 15. Quiding-Järbrink M, Nordström I, Granström G, et al: Differential expression of tissue-specific adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric, and nasal immunizations. *J Clin Invest* 99(6):1281-1286, 1997.