

Um Estudo Comparativo da Imunidade Protetora Proporcionada pelas Vacinas Orais, Intranasais e Parentais contra a *Bordetella bronchiseptica* Canina

Laurie J. Larson
Bliss E. Thiel
Patricia Sharp
Ronald D. Schultz

Departamento de Ciências Patobiológicas, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Wisconsin Madison, Madison, Wisconsin.

PALAVRAS-CHAVES: *Bordetella bronchiseptica*, Vacinas, Complexo de Doença Respiratória Infecciosa Canina, Imunidade Mucosa

RESUMO

O presente estudo foi desenhado para determinar se uma vacina oral, viva, contra *Bordetella bronchiseptica* protege os cães contra o desenvolvimento de sinais de doença respiratória depois de serem submetidos à provocação com *Bordetella bronchiseptica* virulenta. O estudo também foi desenhado para comparar o nível de proteção induzido pela vacina oral com a proteção proporcionada por uma vacina viva intranasal e uma vacina morta injetada. Quarenta Beagles de 6-8 semanas de idade, negativos para cultura e anticorpo para *Bordetella bronchiseptica*, foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos. O Grupo 1 (O) recebeu uma dose única de vacina atenuada oral contra *Bordetella* no dia 14 do estudo; o Grupo 2 (IN) recebeu uma dose única de vacina atenuada intranasal contra *Bordetella* no dia 14 do estudo; o Grupo 3 (SCu) recebeu duas doses de vacina morta contra *Bordetella* administrada por via subcutânea nos dias 0 e 14 do estudo; e o Grupo 4 (C) recebeu solução salina tanto por via intranasal quanto por via subcutânea.

Todos os cães foram submetidos à provocação com *Bordetella bronchiseptica* virulenta por meio de câmara de nebulização no dia 42 do estudo. Sangue e swabs nasais foram coletados semanalmente ao longo do estudo para sorologia e cultura bacteriana. Depois da provocação, avaliações clínicas diárias incluíram temperatura corporal e um escore ponderado de tosse e outros sinais de doença respiratória. Sinais graves de doença no grupo de controle comprovaram a validade de nosso modelo de provocação. Os resultados deste estudo mostraram que a vacina oral contra *Bordetella bronchiseptica* protege os cães da provocação. Esta proteção proporcionada pela vacina oral foi equivalente àquela induzida pela vacina intranasal, e foi superior à proteção oferecida pela vacina morta, administrada por via subcutânea.

INTRODUÇÃO

Bordetella bronchiseptica (*B bronchiseptica*) é o patógeno bacteriano mais importante associado com o Complexo de Doença Respiratória Infecciosa Canina (CIRDC) (Kiel et al. 1998). No entanto, essa doença complexa também é causada por uma variedade de vírus, incluindo:

Vírus da Cinomose Canina (CDV), Adenovírus Canino tipo 2 (CAV-2), Vírus da Parainfluenza Canina 5 (CPI-5), vírus da

Influenza Canina (CIV) e possivelmente outros (Appel et al 1978; Erles et al 2004; Wagoner et al 1984). Além da *Bordetella bronchiseptica*, bactérias como *E. coli* hemolítica, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus* sp., *Pasteurella multocida*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus equi zooepidemicus* e *Mycoplasma* sp. também podem contribuir para a doença (Bemis et al 1977; Mannering et al 2008; Mochizuki et al 2008; Roycroft et al 2006; Ueland 1990). O estresse, a ventilação insuficiente, a higiene inadequada, a poeira e aerossóis criados por lavadoras elétricas também contribuem (Priestnall et al 2012). O latido constante é outro fator quando os cães são colocados em canis de acolhimento ou abrigos para animais com outros cães.

Atualmente, existem três tipos diferentes de vacinas contra a *Bordetella bronchiseptica* licenciadas nos Estados Unidos para uso em cães: uma vacina morta injetável para uso subcutâneo, uma vacina viva atenuada para administração intranasal, e mais recentemente, uma vacina viva atenuada para ser administrada por via oral. A vantagem prática da vacina oral é sua facilidade de administração em comparação com a vacina intranasal. A vacina oral também é capaz de proporcionar imunidade mucosa local semelhante à da vacina intranasal. O presente estudo foi desenhado para comparar os diferentes tipos de vacinas contra *B. bronchiseptica*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

A aprovação do Comitê Institucional de Cuidado e Uso Animal foi obtida para este estudo. Quarenta filhotes Beagle (Ridgland Farms, Inc.) com idade de 6 a 8 semanas foram triados para serem negativos para cultura para *Bordetella bronchiseptica*, e para terem níveis baixos ou nenhum anticorpo contra *B. bronchiseptica* através de testes de ELISA na época da vacinação. Os filhotes selecionados foram designados aleatoriamente para um de quatro grupos e alojados em unidades de isolamento da Unidade Educativa Charmany, Faculdade de Medicina Veterinária de UW-Madison.

Vacinas

O Grupo 1 (O) foi vacinado por via oral com uma dose única de Bronchi-Shield®ORAL

(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc [BIVI]). O Grupo 2 (IN) foi vacinado por via intranasal com uma dose única de Bronchi-Shield®III (BIVI). O Grupo 3 (SCu) foi vacinado por via subcutânea com duas doses de Bronchicine®CAe (Zoetis). O Grupo 4 (C) foi vacinado por vias subcutânea e intranasal com solução salina.

Organismo da Provação

A provação incluiu um conjunto de 3 cepas de *B. bronchiseptica* virulenta. As bactérias foram cultivadas em ágar Bordet-Gengou por 48 horas a 36 ± 2 °C. As bactérias foram colhidas das placas utilizando hastes de vidro estéreis e inoculadas em caldo peptona. Então, a cultura foi mantida a 35 °C até ser utilizada para a provação, que foi administrada dentro de 2 horas depois que a cultura foi colocada no caldo peptona. A dosagem da provação foi de aproximadamente $4,5 \times 10^{10}$ ufc. A cultura bacteriana foi aerossolizada utilizando-se um nebulizador mecânico e uma câmara de retenção anexa. A câmara foi preparada com o material da provação imediatamente antes do uso. Todos os cães foram expostos à provação colocando-os na câmara onde eles inalaram continuamente *bordetella* aerossolizada por 15 a 20 minutos cada.

Desenho Experimental

Soros e swabs nasais foram coletados de todos os filhotes semanalmente ao longo da duração do estudo. Os cães do grupo 3 (SCu) foram vacinados nos dias 0 e 14 do estudo. Os cães de todos os outros grupos foram vacinados apenas no dia 14 do estudo. Swabs nasais adicionais foram coletados para ELISA para determina a imunidade mucosa nos dias 35, 49 e 56 do estudo. A provação nebulizada foi administrada no dia 42 do estudo. Os filhotes foram monitorados diariamente quanto aos sinais clínicos nos dias 35 e 40 (pré-provação) do estudo e, então, diariamente depois da provação até o final do estudo. No dia 55 do estudo, metade dos cães dos grupos que não apresentaram sinais clínicos pós-provação foi liberada. Todos os demais cães foram submetidos à eutanásia humanizada no dia 56 do estudo. Os escores de consolidação pulmonar foram registrados e amostras foram coletadas para cultura e sorologia.

Sinais Clínicos

As observações clínicas incluíram 1) temperaturas retais, 2) tosse (espontânea e induzida), 3) secreção nasal, 4) espirro, 5) dificuldade respiratória, e 6) diminuição da atividade. A febre foi definida como temperatura corporal $\geq 39,5$ °C. Veja a Tabela 1 para conhecer a rubrica de pontuação ponderada.

Sorologia

O anticorpo sérico anti-*Bordetella* foi determinado por ELISA (Dees et al., 1982.) O IgA mucoso anti-*Bordetella* presente nas secreções nasais também foi determinado por ELISA (Bey et al., 1981.)

Tabela 1. Rubrica de Pontuação Clínica

Sinal	Qualificador	Escore
Tosse	Leve	1
Tosse	Induzida	3
Tosse	Espontânea	5
Secreção Nasal	Espessa, muco	2
Espirro	Múltiplos	1
Letargia		10
Dispneia		10

Cultura Bacteriana

Swabs nasais semanais foram riscados em ágar McConkey, e incubados por 24 horas. *Swabs* pulmonares coletados na necropsia foram riscados de forma semelhante. *Bordetella* foi confirmada por crescimento típico, padrão metabólico e morfologia microscópica. O nível de crescimento quantitativo foi relatado como último quadrante da placa que o organismo foi capaz de ser riscado. Um baixo nível de *bordetella*, por exemplo, seria encontrado somente no primeiro quadrante e seria relatado como 1. O nível elevado de crescimento seria relatado como 4 para o quarto quadrante.

Patologia Bruta

A consolidação pulmonar foi avaliada por um patologista que estava em cegamento quanto aos grupos do estudo. A patologia pulmonar foi determinada por palpação direta dos tecidos pulmonares, e registrada como consolidação percentual por lobo. (Larson et al. 2011)

RESULTADOS

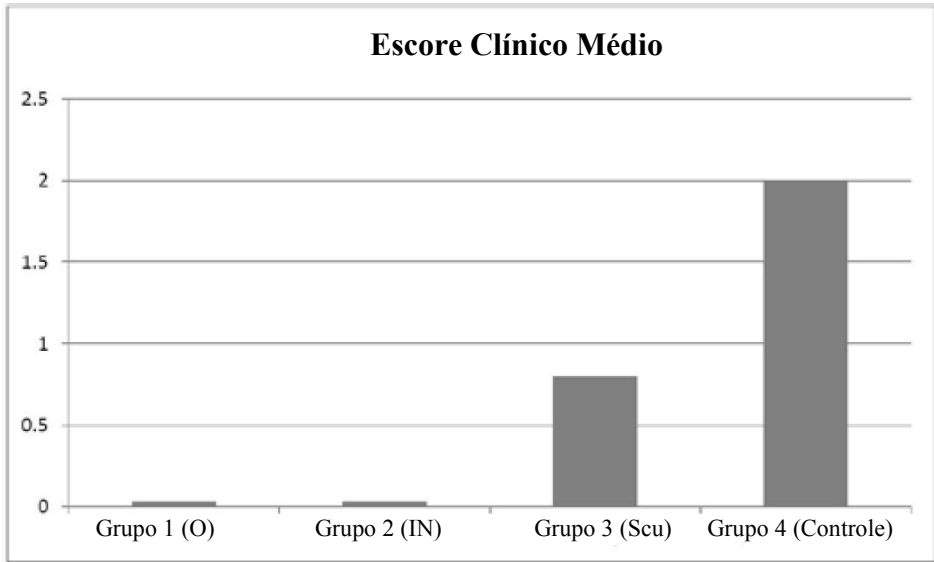
Cultura Bacteriana

Todos os cães continuaram negativos para cultura para *Bordetella bronchiseptica* até o dia 14 do estudo. Com início no dia 21 do estudo, *bordetella* foi detectada esporadicamente em *swabs* nasais em um nível baixo nos Grupos 1 (O) e 2 (IN), que receberam vacinas vivas atenuadas. Os Grupos 3 (SCu) e 4 (C), que receberam vacina morta e solução salina, respectivamente, permaneceram negativos para cultura até depois da provocação. No dia 56 do estudo (necropsia), *B bronchiseptica* foi encontrada em *swabs* nasais de todos os grupos; no entanto, ela apresentou crescimento em níveis mais baixos nos *swabs* coletados do Grupo 1 (O) do que dos outros grupos. *Swabs* traqueais coletados na necropsia (dia 56 do estudo) foram positivos para *Bordetella bronchiseptica* em todos os cães testados, e se desenvolveram em nível equivalentemente elevados. Em geral, os tecidos pulmonares tinham menos probabilidade de abrigar *bordetella* do que as amostras nasais e traqueais. Os cães do Grupo 4 (C) abrigaram levemente mais *bordetella* nos tecidos pulmonares do que os vacinados.

Sinais Clínicos

Os cães tanto do Grupo 1 (O) quanto do Grupo 2 (IN) apresentaram muito poucos sinais de doença pós-provocação. Esses grupos apresentaram escores médios cumulativos de 0,03, com o sinal clínico mais comum sendo tosse leve ocasional sem complicações adicionais. Muitos cães (70%) de ambos os grupos não tossiram. O Grupo 3 (SCu) apresentou um escore cumulativo médio de 0,8. Todos os cães desse grupo apresentaram algum nível de morbidade. Sete de 10 cães (70%) do grupo SCu apresentaram sinais de tosse espontânea, severa, que continuou por diversos dias. Somente três dos dez cães apresentaram sinais clínicos que poderiam ser descritos como tosse leve. O Grupo 4 (C) (controle não vacinado) apresentou sinais de doença respiratória grave, e um escore médio cumulativo de 2,0. Embora um cão desse grupo apresentasse sinais apenas de tosse leve, todos os nove cães remanescentes apresentaram tosse grave, severa em andamento. Dois cães desse grupo precisaram ser submetidos à eutanásia devido à gravidade da doença. Veja o Gráfico 1.

Gráfico 1. Escore Clínico Médio Cumulativo (O número maior indica mais doença clínica significativa)



Temperatura Corporal

Os Grupos 1 (O), 2 (IN), e 3 (SCu) apresentaram temperaturas corporais na faixa normal ao longo do período pós-provacação. No Grupo 4 (C), no entanto, metade do grupo desenvolveu temperaturas corporais de ou acima de 39,5°C por pelo menos um dia. (Dados não mostrados.)

Sorologia

Os níveis séricos médios de IgG em todos os grupos foram muito baixos e foram relatados como OD = 0,3 uma semana antes de o presente estudo ter iniciado. Isso representa soronegatividade em nosso ELISA sérico. Até o dia 35 do estudo (pós-vacinação, mas antes da provacação) todos os grupos apresentaram aumentos significativos na IgG sérica. Os Grupos 1 (O) e 2 (IN) (vacinas orais e intranasais) apresentaram OD média = 0,7. Os Grupos 3 (SCu) e 4 (C) (SQ e controle) apresentaram OD média = 0,8. (Dados não mostrados.)

O ELISA da IgA do swab nasal no dia 35 do estudo (pós-vacinação) mostrou OD média = 0,4 para o grupo oral; OD média = 0,2 para o grupo intranasal; OD média = 0,2 para o grupo parenteral; OD média = 0,1 para o grupo de controle.

Patologia Bruta

O Grupo 1 (O) apresentou muito pouca consolidação, e um escore médio cumulativo de 2,0. O Grupo 2 (IN) incluiu um filhote com valor aberrante que distorceu a média cumulativa desse grupo a um escore de 12,2. Com o outro cão com valor aberrante removido, o escore médio para esse grupo foi 7. O Grupo 3 (SCu) apresentou um escore médio cumulativo de 10. O Grupo 4 (C), de controle, apresentou um escore médio de consolidação cumulativo de 46 devido principalmente a dois cães que precisaram ser submetidos à eutanásia devido à gravidade da doença. Veja o Gráfico 3.

DISCUSSÃO

Muitos estudos anteriores demonstraram que *B bronchiseptica* tem um papel significativo no complexo de doença respiratória infecciosa canina (CIRDC) (Appel et al 1978; Bemis et al 1977; Keil et al 1998). Demonstrou-se, também, que as vacinas contra *B bronchiseptica* reduzem a gravidade dos sinais clínicos associados com o CIRDC (Edinboro et al 2004; Glickman et al 1981; Kontor et al 1981; Lehar et al 2008).

A primeira vacina contra *B bronchiseptica* a ser licenciada foi um produto injetável morto, que demonstrou reduzir significativamente os sinais clínicos da doença

(Ellis et al 2001, 2002).

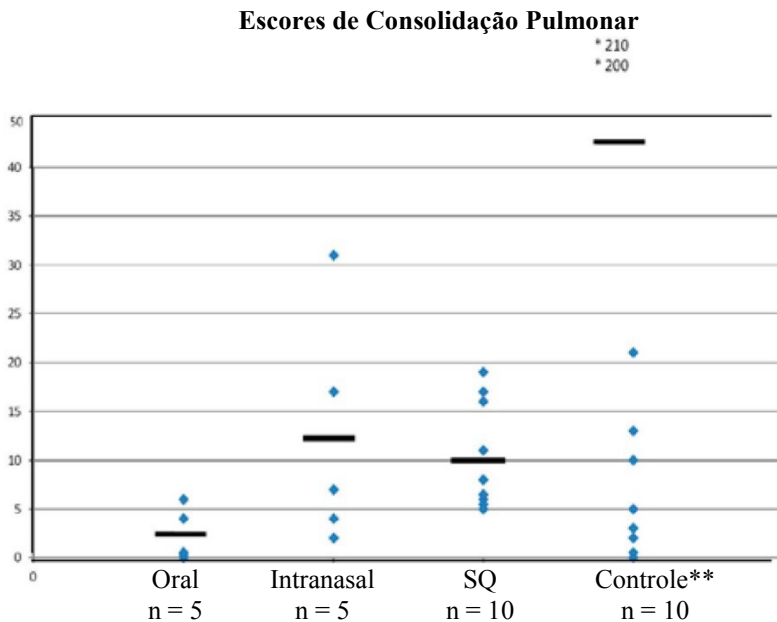
A vacina morta foi seguida pelo desenvolvimento de uma vacina viva atenuada administrada por via intranasal. A eficácia do produto intranasal na redução da doença clínica foi considerada superior aos produtos injetáveis mortos (Chladek et al 1981; Davis et al 2007). Uma vantagem adicional da vacina viva atenuada em comparação com o produto morto é que ela demonstrou induzir imunidade depois de uma única dose, e demonstrou oferecer proteção depois de apenas 72 horas (Gore et al 2005).

No entanto, as vacinas intranasais são mais difíceis de serem administradas do que um produto injetável, portanto, são menos populares entre os veterinários. A vacina parenteral continua sendo o produto contra *bordetella* mais comumente utilizado. Recentemente, uma vacina viva atenuada, oral, contra *Bordetella* foi licenciada. A vacina oral contra *Bordetella* proporcionou imunidade que foi semelhante àquela induzida pelo produto intranasal, mas ela é mais facilmente administrada do que o produto intranasal (Hess et al 2011). Sobretudo, no presente estudo nós demonstramos que a imunidade da IgA Secretora local foi induzida pelas vacinas administradas tanto por via oral quanto por via

intranasal.

O mecanismo imunológico de proteção proporcionado pela vacina não foi bem definido para *Bordetella bronchiseptica* (Chalker et al 2003). Não se sabe se as endotoxinas bacterianas têm um papel em causar patologia no trato respiratório superior, bem como no pulmão. A neutralização dessas endotoxinas pelo anticorpo secretor produzido localmente, mais provavelmente da classe da IgA, bem como pelo anticorpo IgG produzido sistemicamente que pode alcançar o pulmão através do soro, seria importante para reduzir a patologia causada pelas toxinas. Espera-se, também, que as secreções contendo IgA e o soro contendo principalmente anticorpo IgG (mas, também, alguma IgA) para *Bordetella bronchiseptica* proporcionaria proteção nos pulmões através da transudação. O anticorpo secretor é induzido pelas vacinas intranasais e orais administradas localmente, ao passo que se esperaria que as vacinas mortas administradas sistemicamente produzissem IgG e IgA sérico, mas não produzissem IgA secretora local. A IgA secretora é produzida pelos cães que foram vacinados com *bordetella* viva que se replica principalmente no trato respiratório superior e/ou intestinal.

Gráfico 3. Escores de Consolidação Pulmonar (As barras indicam escores médios)



No presente estudo de provocação, e também em estudos de vacinas anteriores onde vacinas vivas contra *bordetella* administradas por via intranasal foram comparadas com vacinas mortas administradas sistemicamente, a proteção da doença clínica foi maior com as vacinas vivas (Davis et al, 2007). No presente estudo, os cães submetidos à provocação com *Bordetella bronchiseptica* altamente virulenta, mostrou-se que a gravidade da doença era mais grave nos cães de controle (não vacinados). A doença clínica foi menos grave no grupo vacinado com a vacina contra *Bordetella bronchiseptica* administrada por via parenteral do que no grupo de controle. No entanto, as vacinas bacterianas vivas administradas por via oral ou intranasal proporcionaram a maior proteção contra o desenvolvimento da doença clínica. A administração da vacina viva contra *bordetella* administrada pela via intranasal demonstrou anteriormente por outros que é superior à vacina morta administrada pela via parenteral (Davis et al 2007). No presente estudo, bem como em um estudo anterior (Hess et al 2011), uma vacina viva administrada pela via oral proporcionou um nível de proteção contra a doença clínica superior àquele proporcionado pela vacina morta parenteral, e equivalente àquele proporcionado pela mesma vacina viva administrada pela via intranasal. Muito embora o mecanismo exato de proteção melhorado da vacina oral ainda tenha que ser determinado, os cães que receberam a vacina oral no presente estudo tinham anticorpos tanto IgG quanto IgA para *bordetella* no soro e nas secreções nasais semelhantes aos cães vacinados por via intranasal com vacinas vivas. Existem estudos em andamento para determinar o mecanismo para a maior proteção proporcionada pelas vacinas vivas administradas pelas vias oral ou intranasal em comparação com a vacina morta administrada pela via parenteral. Espesula-se que a proteção maior proporcionada pelas vacinas vivas administradas por via oral ou intranasal seja devida à heterogeneidade do anticorpo produzido para múltiplos epítomos antigênicos proporcionados pela *Bordetella bronchiseptica* replicante versus os epítomos antigênicos mais restritivos apresentados com um produto morto administrado por via parenteral. Além da proteção proporcionada pelos anticorpos IgG e IgA produzidos sistemicamente e anticorpos IgA secretores produzidos

localmente, outras proteínas protetoras são provavelmente produzidas pelas vacinas bacterianas vivas que provavelmente oferecem proteção depois da recuperação da doença.

No presente estudo, *bordetella* foi submetida à cultura a partir de cães que receberam a vacina por via oral e viva por via intranasal antes da provocação demonstrando que os organismos *bordetella* da vacina estavam presentes. Ao contrário, *bordetella* não foi submetida à cultura a partir do grupo que recebeu a vacina morta por via parenteral ou do grupo de controle antes da provocação, conforme esperado. Outra possível explicação para a diferença na proteção contra a doença clínica proporcionada pelas vacinas vivas IN e O administradas localmente e a vacina parenteral é baseada na diferença entre a IgA secretora e a IgA não secretora. A IgA é uma imunoglobulina dimérica que contém um componente secretor. A IgA não secretora é uma imunoglobulina monomérica sem um componente secretor. O componente secretor permite que a imunoglobulina seja mais eficaz no controle da infecção ou na neutralização das endotoxinas produzidas pela *Bordetella bronchiseptica*. Existem estudos em andamento em uma tentativa para determinar os mecanismos precisos que oferecem proteção aumentada observada quando as vacinas vivas administradas localmente são utilizadas. Infelizmente, os mecanismos de imunidade protetora para *Bordetella bronchiseptica* são pouco compreendidos (Erles et al 2010).

No presente estudo, as três vacinas contra *bordetella* atualmente licenciadas nos EUA (oral, intranasal e injetável) foram comparadas. Os resultados mostram que a vacina oral contra *bordetella* se comparou muito favoravelmente com a vacina intranasal contra *bordetella* e ambas proporcionaram maior proteção do que a vacina morta injetável contra *bordetella* na redução da doença clínica. A vacina oral tem a vantagem de ser mais facilmente administrada do que o produto intranasal. As vacinas vivas tanto oral quanto intranasal proporcionam melhor proteção contra a doença causada por *Bordetella bronchiseptica* em cães do que a proteção oferecida pelo produto morto injetável.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a vacina atenuada oral contra *Bordetella bronchiseptica* protege cães da provocação que criou doença significativa em cães não vacinados e em cães de controle submetidos à provocação. Essa proteção foi equivalente àquela induzida pela vacina intranasal contra *Bordetella bronchiseptica*, e foi superior à proteção oferecida pela vacina morta, administrada pela via subcutânea. A vacina oral contra *Bordetella bronchiseptica* oferece uma alternativa conveniente às vacinas intranasais devido à facilidade de administração e uma alternativa às vacinas mortas injetáveis devido à eficácia melhorada.

AGRADECIMENTOS

A Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. forneceu recursos para este estudo. Obrigado ao Sr. Hunter Larson pela assistência com a coleta de amostras, e à Claudia Hirsch e à equipe da Unidade Animal Charmany pelo cuidado diário dos cães de nosso estudo. Obrigado também à equipe da Ridgland Farms pela coleta de amostras de sangue e nasais pré-estudo.

REFERÊNCIAS

- Appel M, Bemis DA. The canine contagious respiratory disease complex (kennel cough). *Cornell Vet*. 1978 Jan;68 Suppl 7:70-5.
- Bemis DA, Greisen HA, Appel MJ. Pathogenesis of canine bordetellosis. *J Infect Dis*. 1977 May;135(5):753-62.
- 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*. 1981 Jul;42(7):1130-2.
- Chalker VJ, Toomey C, Opperman S, Brooks HW, Ibuoye MA, Brownlie J, Rycroft AN. Respiratory disease in kennelled dogs: serological responses to *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide do not correlate with bacterial isolation or clinical respiratory symptoms. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 May;10(3):352-6.
- Chladek DW, Williams JM, Gerber DL, Harris LL, Murdock FM. Canine parainfluenza-Bordetella bronchiseptica vaccine immunogenicity. *Am J Vet Res*. 1981 Feb;42(2):266-70.
- Davis R, Jayappa H, Abdelmagid OY, Armstrong R, Sweeney D, Lehr C. Comparison of the mucosal immune response in dogs vaccinated with either an intranasal avirulent live culture or a subcutaneous antigen extract vaccine of *Bordetella bronchiseptica*. *Vet Ther*. 2007 Spring;8(1):32-40.
- Dees C, Fountain MW, Panangala VS, Swango LJ, Schultz RD. An ELISA test to detect antibody to *Bordetella bronchiseptica*. *Vet Immunol Immuno-pathol*. 1982 Nov;3(6):539-45.
- Edinboro CH, Ward MP, Glickman LT. A placebocontrolled trial of two intranasal vaccines to prevent tracheobronchitis (kennel cough) in dogs entering a humane shelter. *Prev Vet Med*. 2004 Feb 26;62(2):89-99. Erratum in: *Prev Vet Med*. 2005 Jul 12;69(3-4):309-10.
- 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. *J Am Vet Med Assoc*. 2002 Jan 1;220(1):43-8.
- Ellis JA, Haines DM, West KH, Burr JH, Dayton A, Townsend HG, Kanara EW, Konoby C, Crichlow A, Martin K, Headrick G. Effect of vaccination on experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2001 Feb 1;218(3):367-75.
- Erles K, Brownlie J. Expression of B-defensins in the canine respiratory tract and antibiobacterial activity against *Bordetella bronchiseptica*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010 (135): 12-19.
- Erles K, Dubovi EJ, Brooks HW, Brownlie J. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *J Clin Microbiol*. 2004 Oct;42(10):4524-9.
- Glickman LT, Appel MJ. Intranasal vaccine trial for canine infectious tracheobronchitis (kennel cough). *Lab Anim Sci*. 1981 Aug;31(4):397-9.
- Gore T, Headley M, Laris R, Bergman JG, Sutton D, Horspool LJ, Jacobs AA. Intranasal kennel cough vaccine protecting dogs from experimental *Bordetella bronchiseptica* challenge within 72 hours. *Vet Rec*. 2005 Apr 9;156(15):482-3.
- Hess T, Parker D, Hassal A, Chiang Y. Evaluation of efficacy of oral administration of *Bordetella bronchiseptica* intranasal vaccine when used to protect puppies from tracheobronchitis due to *Bordetella bronchiseptica* infection. *Intern J Appl Res Vet Med*. 2011; 9(3): 300-305.
- Keil DJ, Fenwick B. Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1998 Jan 15;212(2):200-7. Review. Erratum in: *J Am Vet Med Assoc* 1998 Mar 1;212(5):657.

- Kontor EJ, Wegrzyn RJ, 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.* 1981 Oct;42(10):1694-8.
- Larson LJ, Henningson J, Sharp P, Thiel B, Deshpande MS, Davis T, Jayappa H, Wassmoen T, Lakshmanan N, Schultz RD. Efficacy of the canine influenza virus H3N8 vaccine to decrease severity of clinical disease after cochallenge with canine influenza virus and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Apr;18(4):559-64.
- Lehar C, Jayappa H, Erskine J, Brown A, Sweeney D, Wassmoen T. Demonstration of 1-year duration of immunity for attenuated *Bordetella bronchi-septica* vaccines in dogs. *Vet Ther.* 2008 Win- ter;9(4):257-62.
- Mannering SA, McAuliffe L, Lawes JR, Erles K, Brownlie J. Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease. *Vet Microbiol.* 2009 Mar 30;135(3-4):292-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.058. Epub 2008 Sep 21.
- Mochizuki M, Yachi A, Ohshima T, Ohuchi A, Ishida T. Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. *J Vet Med Sci.* 2008 Jun;70(6):563-9.
- Priestnall SL, Smith KC. Canine infectious respiratory disease: tackling the unknown unknowns. *Vet J.* 2012 Mar;191(3):271-2. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.12.013. Epub 2012 Jan 20.
- Rycroft AN, Tsounakou E, Chalker V. Serological evidence of *Mycoplasma cynos* infection in canine infectious respiratory disease. *Vet Microbiol.* 2007 Mar 10;120(3-4):358-62. Epub 2006 Nov 23.
- Ueland K. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway. *Vet Rec.* 1990 May 12;126(19):481-3.
- Wagener JS, Sobonya R, Minnich L, Taussig LM. Role of canine parainfluenza virus and *Bordetella bron-chiseptica* in kennel cough. *Am J Vet Res.* 1984 Sep;45(9):1862-6.