

# ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA CINOMOSE DE CÃES VACINADOS EM DIFERENTES ESTABELECIMENTOS

Fabiana dos Santos Monti<sup>1</sup>  
José Antônio Viana<sup>1</sup>  
Paula Dias Bevilacqua<sup>1</sup>  
Mauro Pires Moraes<sup>1</sup>  
Joaquín Hernan Patarroyo Salcedo<sup>1</sup>

## RESUMO

Observações de casos clínicos suspeitos de cinomose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, indicaram que os cães vacinados em lojas que comercializam produtos agropecuários apresentavam maior frequência da doença, quando comparados aos cães vacinados em clínicas veterinárias. Com o objetivo de avaliar a resposta imunológica às vacinas comercializadas em diferentes estabelecimentos, seguindo ou não o protocolo de vacinação indicado pela literatura, foi determinado o título de anticorpos contra a cinomose no soro de cães da área urbana do município de Viçosa-MG. Para isso, uma amostra de soro sanguíneo foi obtida de 150 cães saudáveis, entre seis meses e seis anos de idade, selecionados segundo características pré-estabelecidas para compor cinco grupos de 30 animais. O título de anticorpos foi mensurado no soro de cada animal por meio do teste de soroneutralização. Os resultados deste estudo demonstraram que não houve diferença em vacinar os cães contra cinomose em clínicas veterinárias ou em lojas de produtos agropecuários, desde que a vacinação fosse realizada seguindo o protocolo indicado pela literatura. A qualidade das vacinas comercializadas em clínicas veterinárias e lojas de produtos agropecuários deve ser avaliada diante da grande porcentagem de títulos negativos e de títulos abaixo do considerado protetor em todos os grupos de cães vacinados.

**Palavras-chave:** Vírus da cinomose canina, vacinação, cães, anticorpos neutralizantes, teste de soroneutralização.

## ABSTRACT

### ANTIBODY AGAINST DISTEMPER VIRUS IN DOGS VACCINATED IN VETERINARY CLINICS AND PET SHOPS

Observations of clinical cases suspected of distemper, attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa, indicated that the dogs vaccinated in agricultural product stores showed a higher frequency of the disease compared to the ones vaccinated at veterinary clinics. Having as the main objective of this study the evaluation of the response to vaccines sold at pet shops and clinics, following or not the vaccination protocol indicated in the literature, antibody titers against distemper were determined in the serum of dogs from the urban area of Viçosa-MG. To carry out this study, individual blood serum samples were collected from 150 selected healthy dogs, with ages between six months to six years old, selected following pre-established parameters to form five groups of 30 animals each. The antibody titers were measured in each serum sample using the serum neutralization test. Results showed that there were no differences in relation to vaccinating at veterinary clinics or pet shops, if the vaccination technique is carried out following the protocol indicated in the literature. The quality of the vaccines sold at veterinary clinics and pet shops should be evaluated because of the large percentage of negative titers and titers below the ones considered as protective in all groups of vaccinated dogs.

**Keywords:** Canine distemper virus, vaccination, dogs, neutralizing antibodies, serum-neutralization test.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária da Viçosa, MG. E-mail: fabianamonti@bol.com.br

## INTRODUÇÃO

A cinomose é uma enfermidade viral dos cães, altamente contagiosa, com letalidade de quase 90% quando há envolvimento do sistema nervoso (Swango, 1997). A imunização consiste no único meio efetivo de controle da cinomose na população canina, e as vacinas com vírus vivo atenuado têm sido efetivas em proteger os cães contra a doença (Gouveia *et al.*, 1987; Greene, 1990; Greene & Appel, 1998).

Falhas vacinais ocorrem, e vários fatores podem influenciá-las (Povey, 1986; Coyne, 2000). As diferenças individuais de animais vacinados, como genética, idade, nutrição, estado de saúde, meio ambiente e situações de estresse, são importantes para o resultado da imunização (Webster, 1975; Povey, 1986; Osburn & Stott, 1989; Coyne, 2000).

Entre os fatores inerentes ao imunógeno, os principais responsáveis pelas falhas vacinais são o isolado viral utilizado, a manutenção da imunogenicidade suficiente durante todo o processo de atenuação do antígeno e o número de partículas virais atenuadas em uma dose (Rikula *et al.*, 2000). Vacinas que foram manuseadas e estocadas indevidamente também podem resultar em falha vacinal, uma vez que as vacinas contendo vírus vivo atenuado devem ser mantidas sob refrigeração todo o tempo (Greene & Appel, 1998; Tizard & Ni, 1998).

Tanto a imunidade humoral quanto a mediada por células são importantes na proteção contra a cinomose. As vacinas têm um importante papel em estimular ambos os mecanismos (Greene, 1990). Entretanto, a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura, que objetivou avaliar a eficácia das vacinas contra cinomose em cães, baseou-se na quantificação dos anticorpos.

O teste de soroneutralização tem sido o mais utilizado para a detecção e quantificação de anticorpos contra o vírus da cinomose, pois são mensurados somente os anticorpos direcionados contra epítopos específicos do vírus, envolvidos com a infecção celular (Murphy *et al.*, 1999).

Observações de casos clínicos suspeitos de cinomose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (HOV-UFV), levaram à hipótese de que os cães que recebiam vacinas comercializadas em lojas de produtos agropecuários, locais que geralmente não contam com a orientação de um Médico Veterinário, apresentavam maior frequência da doença, quando comparados aos cães vacinados em clínicas veterinárias.

Este estudo teve como objetivo determinar, por meio do teste de soroneutralização, os níveis séricos de anticorpos contra o vírus da cinomose em cães não-vacinados ou vacinados, seguindo ou não o protocolo indicado pela literatura, em diferentes estabelecimentos responsáveis pela vacinação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no município de Viçosa- MG entre dezembro de 2001 e outubro de 2003. Amostras de sangue de cães vacinados ou não contra cinomose foram coletadas de animais provenientes da área urbana de Viçosa-MG. As amostras foram tomadas de cães saudáveis no HOV-UFV, em clínicas veterinárias particulares e em residência de proprietários.

Uma única amostra de sangue foi obtida de cada animal, selecionados aleatoriamente, segundo características pré-estabelecidas. Cada grupo foi composto por 30 cães, entre seis meses e seis anos de idade, independentemente da raça ou de sexo, totalizando 150 animais:

Grupo A - Cães vacinados em clínicas veterinárias, seguindo o protocolo indicado na literatura (n = 30).

Grupo B - Cães vacinados em clínicas veterinárias, não seguindo o protocolo indicado na literatura (n = 30).

Grupo C - Cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, seguindo o protocolo indicado na literatura (n = 30).

Grupo D - Cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, não seguindo o protocolo indicado na literatura (n = 30).

Grupo E - Cães não-vacinados (n = 30).

O protocolo de vacinação indicado na literatura consistiu de três doses da vacina contendo o antígeno viral da cinomose, que compunha-se de vírus vivo modificado, associado a outros antígenos (vacinas polivalentes), administradas em intervalos de 21 a 30 dias, em cães que iniciaram a vacinação com 45 ou 60 dias, ou duas doses da vacina, no mesmo intervalo, em cães que começaram a imunização a partir de três meses de idade e, nos dois casos, os animais receberam revacinações anuais. Os cães que não receberam a vacinação inicial como indicado acima, ou que não receberam as revacinações anuais, foram reunidos nos grupos em que a vacinação não seguiu o protocolo indicado, mas foram incluídos os cães que haviam recebido a última dose de vacina há mais de 30 dias.

Para a coleta de sangue, foi realizada venopunção da veia cefálica ou jugular, visando a obtenção do soro, sendo este alicotado e congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização do teste de soroneutralização.

Concomitantemente à coleta de sangue, foi aplicado um questionário aos proprietários dos cães participantes do estudo, para a obtenção de informações referentes ao histórico de vacinação do animal. As datas e os locais de todas as vacinações foram registrados, assim como a idade, o sexo, a raça do cão, o histórico de doenças anteriores e a frequência de contato com outros cães.

Para a avaliação quantitativa de anticorpos contra o vírus da cinomose nos soros, foi desenvolvido o teste de soroneutralização em microplacas (Nunclon-NUNC Brand Products - Roskilde, Dinamarca), segundo técnica descrita por Appel & Robson (1973), com as seguintes modificações: uma cultura celular de células renais caninas (MDCK – ATCC CCL-34 - Manassas, EUA) na 257ª passagem. As células foram mantidas em meio de cultivo DMEM- “Dulbecco Modified Eagle’s Medium” (Sigma D-5280 – St. Louis, EUA), suplementado com 1 mL de antibiótico-antimicótico (Sigma A 7292 - St. Louis, EUA); 1 mL de solução L-glutamina a 2 %, para cada 100 mL de DMEM e 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Seromed – Berlim, Alemanha). O cultivo celular foi alicotado e armazenado em nitrogênio líquido para posterior utilização nos testes de soroneutralização. Neste estudo, os testes foram realizados com as células MDCK, nas quais o efeito citopático do vírus foi mais bem avaliado em relação às células VERO.

O isolado Snyder Hill (ATCC VR-526 – Manassas, EUA) do vírus da cinomose foi utilizado para os testes. O vírus foi propagado em células MDCK na 255ª passagem e mantido em Meio Essencial Mínimo (Cultilab – Campinas, Brasil), suplementado com 0,2g/L de estreptomicina, 0,15g/L de penicilina G potássica e 10% SFB, em pH 7,2. A 3ª passagem do vírus nestas células foi alicotada e armazenada em nitrogênio líquido para ser utilizada nos testes de soroneutralização.

Os soros coletados foram diluídos em meio de cultivo DMEM suplementado como descrito, obtendo-se diluições seriadas de 1:10 a 1:640, sendo cada soro testado em duplicata. Uma concentração viral constante de 100 doses infectantes por cultura de tecido ( $100\text{ DICT}_{50\%}/\text{ml}$ ) foi misturada a igual volume de soro a ser testado. As placas com a mistura soro-vírus foram incubadas por uma hora em estufa de  $\text{CO}_2$  (5%  $\text{CO}_2$ , com 70% de umidade e a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para que ocorresse a neutralização do vírus pelo anticorpo.

Após uma hora de incubação, aproximadamente 15.000 células MDCK em 50 ml de DMEM suplementado foram adicionadas a cada um dos 96 “pocinhos” da placa de soroneutralização. Em seguida, as placas foram incubadas novamente em estufa de  $\text{CO}_2$  e, após seis dias, procedeu-se à leitura em microscópio invertido, para verificar a presença ou ausência de efeitos citopáticos.

A atividade neutralizante do soro foi expressa como a maior diluição dos anticorpos que protegeu as células contra o efeito citopático. O título viral foi calculado pelo método de Reed & Muench (1938). Os títulos de anticorpos abaixo de 1:10 foram considerados negativos.

O estudo constituiu-se de um delineamento inteiramente casualizado. Foi realizada análise de variância, desdobrando-se os efeitos em graus individuais de liberdade, por meio de contrastes ortogonais, no intuito de comparar os títulos dos diversos grupos. O título influenciado por contato com outros cães foi comparado pelo teste “t” de Student. Foram consideradas significativas as comparações entre médias até 10% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo de cães não-vacinados (grupo E) apresentou menor título médio de anticorpos em comparação a todos os grupos de cães vacinados ( $p=0,003$ ) (Tabelas 1 e 2). Dos 30 cães não vacinados do grupo E, 90% (27/30) não apresentaram título de anticorpos contra o vírus da cinomose, sugerindo que não entraram em contato com o vírus, uma vez que não apresentaram sinais anteriores sugestivos da doença. Além disso, provavelmente, também não foram subclínicamente infectados, já que, segundo Appel (1969), os cães com infecção subclínica produzem anticorpos contra o vírus.

O título médio de anticorpos dos cães vacinados em clínicas veterinárias, independentemente do protocolo indicado pela literatura (grupos A e B), foi maior do que o título médio de anticorpos dos cães vacinados em lojas que comercializam produtos agropecuários (grupos C e D), conforme o contraste: AB vs CD ( $p=0,079$ ) (Tabelas 1 e 2).

Quando contrastes adicionais foram realizados, no entanto, observou-se que o título médio de anticorpos do grupo de cães vacinados em clínicas veterinárias não seguindo o protocolo (grupo B) foi maior do que o título médio de anticorpos dos cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, também não seguindo o protocolo indicado (grupo D) ( $p=0,042$ ) (Tabelas 1 e 2). Este fato, portanto, foi o responsável pela diferença obser-

**Tabela 1** - Média dos títulos de anticorpos ( $\log_{10}$ ) neutralizantes contra o vírus da cinomose, em função do protocolo e do estabelecimento responsável pela vacinação

Grupos <sup>a/</sup>	Média ( $\log_{10}$ )
A	0,7609 (15) <sup>b/</sup>
B	0,7344 (13)
C	0,6677 (11)
D	0,3204 (6)
E	0,1560 (3)

<sup>a/</sup> A = cães vacinados em clínicas veterinárias seguindo o protocolo indicado na literatura; B = cães vacinados em clínicas veterinárias não seguindo o protocolo indicado na literatura; C = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários seguindo o protocolo indicado na literatura; D = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários não seguindo o protocolo indicado na literatura; E = cães não vacinados;

<sup>b/</sup> entre parênteses: número de cães com título de anticorpos positivo.

vada entre os grupos AB e CD, uma vez que o título médio de anticorpos não diferiu entre os cães vacinados seguindo o protocolo indicado, em clínicas veterinárias ou lojas de produtos agropecuários (grupos A e C, respectivamente) ( $p = 0,631$ ) (Tabelas 1 e 2).

Observou-se também que houve diferença entre os títulos de anticorpos dos cães vacinados, seguindo ou não o protocolo indicado, em lojas de produtos agropecuários (grupos C e D) ( $p = 0,089$ ), mas não para os cães vacinados em clínicas veterinárias, independentemente do protocolo (grupos A e B) ( $p = 0,912$ ) (Tabelas 1 e 2). De acordo com estas observações, pode-se inferir que não há diferença entre vacinar um cão em uma loja de produtos agropecuários ou em uma clínica veterinária, desde que a vacinação seja feita dentro do protocolo indicado, ou seja, duas ou três doses de vacina quando filhote e revacinações quando adultos.

A composição dos grupos B e D foi homogênea, sendo formados, em sua maioria, por cães que não receberam a revacinação anual. A diferença observada entre os dois grupos (Tabelas 1 e 2) poderia ser explicada pelos diferentes tipos de cães que freqüentam ambos os estabelecimentos. Os cães vacinados em clínicas veterinárias pertencem a proprietários com melhor poder aquisitivo, considerando o maior custo das vacinas comercializadas, quando comparados com cães vacinados em lojas de produtos agropecuários. Conseqüentemente, os primeiros tendem a receber melhor alimentação e cuidados com a saúde, fatores que, segundo Povey (1986) e Osburn & Stott (1989), influenciam positivamente na resposta imune. No entanto, esta explicação não se justifi-

**Tabela 2** - Contrastes dos títulos ( $\log_{10}$ ) de anticorpos neutralizantes contra o vírus da cinomose, em função do protocolo e do estabelecimento responsável pela vacinação

FV <sup>a/</sup>	QM <sup>b/</sup>	p <sup>c/</sup>
<b>Contrastes Ortogonais</b>		
E vs ABCD <sup>d/</sup>	5,185	0,003**
AB vs CD	1,929	0,079 <sup>o</sup>
A vs B	0,011	0,912
C vs D	1,809	0,089 <sup>o</sup>
<b>Contrastes Adicionais</b>		
A vs C	0,130	0,631
B vs D	2,570	0,042*

<sup>a/</sup> FV = Fonte de Variação; <sup>b/</sup> QM = Quadrado Médio; <sup>c/</sup> p = probabilidade; <sup>d/</sup> A = cães vacinados em clínicas veterinárias seguindo o protocolo indicado na literatura; B = cães vacinados em clínicas veterinárias não seguindo o protocolo indicado na literatura; C = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários seguindo o protocolo indicado na literatura; D = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários não seguindo o protocolo indicado na literatura; E = cães não vacinados; \*\*, \* e <sup>o</sup>, significativo a 1, 5 e 10 % de probabilidade, respectivamente.

ca plenamente, já que os títulos de anticorpos entre os grupos A e C, também vacinados em clínicas veterinárias e lojas de produtos agropecuários, respectivamente, não diferiram (Tabelas 1 e 2). Uma outra explicação para a diferença entre os grupos B e D seria a má conservação das vacinas comercializadas em lojas de produtos agropecuários. Entretanto, esta explicação também não se justifica, pois os títulos de anticorpos entre os grupos A e C não diferiram (Tabelas 1 e 2).

Dessa forma, pode-se inferir que as vacinas comercializadas em lojas de produtos agropecuários não foram capazes de promover imunidade tão prolongada quanto às vacinas de clínicas veterinárias. Entretanto, mais estudos são necessários para que esta diferença possa ser explicada, podendo ser superada, como já mencionado, vacinando-se os cães segundo o protocolo indicado pela literatura.

Vários trabalhos que mensuraram os anticorpos contra o vírus da cinomose, por meio da soroneutralização, consideraram protegidos os cães que desenvolveram títulos de anticorpos a partir de 1:100 (York & Burch, 1961; Povey, 1986; McCaw *et al.*, 1998). Esse título também foi definido como protetor, após os cães terem sobrevivido ao desafio de exposição com vírus selvagem, em trabalho realizado por Appel (1969).

Uma grande porcentagem de títulos negativos foi encontrada em todos os grupos de cães vacinados, o que

não era esperado: grupo A = 50% (15/30), B = 56,7% (17/30), C = 63,3% (19/30), D = 80% (24/30). Além disso, entre os cães vacinados que apresentaram títulos detectáveis, a porcentagem dos títulos de anticorpos neutralizantes considerados protetores pela literatura ( $> 1:100$ ) foi baixa: grupo A = 13,33% (2/15), B = 30,77% (4/13), C = 27,27% (3/11) e D = 33,33% (2/6), sendo o título máximo observado de 1: 320.

A amostragem realizada não permite que sejam feitas inferências sobre a população canina de Viçosa-MG. Porém, se o grande número de casos suspeitos da doença, atendidos todos os anos no HOV-UFV, tratar-se realmente de infecção pelo vírus da cinomose, é possível que este fato seja uma conseqüência da baixa imunidade desta população, de forma geral, e não apenas dos cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, como suspeitado inicialmente. Dessa forma, pesquisas devem ser desenvolvidas para avaliar a imunogenicidade das vacinas comercializadas atualmente, tanto em clínicas veterinárias quanto em lojas de produtos agropecuários.

Como poucos animais que receberam vacinas polivalentes alcançaram títulos de anticorpos protetores neste estudo, pode-se sugerir que especial atenção seja dada à avaliação dessas vacinas, uma vez que Biazzone *et al.* (2001) observaram título médio de anticorpos elevado (1: 4016) ao vacinarem cães com vacina monovalente contra o vírus da cinomose.

Segundo Davies & Pidford (1991), as vacinas polivalentes comprometem o desenvolvimento de uma adequada resposta imune. Estes autores sugeriram que vacinas com múltiplos componentes devem ser usadas com cautela, pois demonstraram que uma vacina contendo cinco antígenos diferentes, incluindo o da cinomose, promoveu uma resposta menor no título de anticorpos contra todas as doenças, quando comparada à aplicação de uma vacina com três antígenos.

Também para Schultz (1995), quanto mais componentes são combinados em uma única vacina, maior será a interferência de um antígeno com outro. Neste caso, há competição entre as células apresentadoras de antígeno, podendo impedir que o animal responda adequadamente a cada um deles. Outros autores, no entanto, relataram a eficácia das vacinas polivalentes para proteger os cães contra cinomose (Coyne, 2000; Kim *et al.*, 2004; Mouzin *et al.*, 2004), o que reforça a necessidade de estudos mais conclusivos.

Para avaliar se o contato com outros cães influenciou os títulos de anticorpos encontrados, a comparação entre o título de anticorpos em relação à frequência de contato com outros cães foi analisada, pelo teste “t” de

Student, para os grupos A, B e C. No grupo D, esta análise foi inviabilizada, porque todos os títulos positivos pertenciam aos cães com contato freqüente. Isto não significa que o contato tenha sido o fator determinante no título de anticorpos deste grupo, uma vez que, no grupo E, dos 27 cães que não apresentaram títulos detectáveis, 77,8% (21/27) tiveram, em algum momento, contato com outros cães. No grupo E, a quantidade de títulos negativos também impediu a comparação.

A média dos títulos de anticorpos dos animais que nunca tiveram tido contato com outros cães foi comparada, separadamente, com a média dos títulos de anticorpos dos cães que tiveram algum tipo de contato, classificado, segundo os proprietários dos cães, como raro, eventual ou freqüente. Em todos os grupos estudados, o título de anticorpos não foi influenciado pela existência ou não de contato com outros cães, independente da frequência deste (Tabela 3), como observado por Dezengrini (2005). Este resultado indica que os títulos de anticorpos mensurados pelo teste de soroneutralização, provavelmente, foram conseqüentes da vacinação anterior e não do contato com outros cães.

**Tabela 3** - Valores “t” de Student para as comparações dos títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus da cinomose, em função do contato com outros cães

Comparações	Valores de “t”
<b>Grupo A<sup>a/</sup></b>	
Nunca <sup>b/</sup> vs Raro	0,726 (p > 0,10)
Nunca vs Eventual	0,296 (p > 0,10)
Nunca vs Freqüente	-0,268 (p > 0,10)
<b>Grupo B</b>	
Nunca vs Raro	-0,475 (p > 0,10)
Nunca vs Eventual	-0,602 (p > 0,10)
Nunca vs Freqüente	-0,336 (p > 0,10)
<b>Grupo C</b>	
Nunca vs Raro	1,123 (p > 0,10)
Nunca vs Eventual	0,318 (p > 0,10)
Nunca vs Freqüente	0,754 (p > 0,10)

<sup>a/</sup> A = cães vacinados em clínicas veterinárias seguindo o protocolo indicado na literatura;

B = cães vacinados em clínicas veterinárias não seguindo o protocolo indicado na literatura;

C = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários seguindo o protocolo indicado na literatura; <sup>b/</sup> Nunca = cães que nunca haviam tido contato com outros; Raro = contato raro com outros cães; Eventual = contato eventual com outros cães; Freqüente = contato freqüente com outros cães.

## CONCLUSÕES

Neste estudo pôde-se concluir que não há diferença entre vacinar os cães contra cinomose em clínicas veterinárias ou lojas que comercializam produtos agropecuários, desde que a vacinação seja realizada seguindo o protocolo indicado pela literatura, ou seja, duas ou três doses da vacina, em intervalos de 21 a 30 dias, com revacinações dos cães adultos.

O título de anticorpos contra cinomose não foi influenciado pelo contato com outros cães, independentemente da frequência com que este ocorreu.

Diante da grande porcentagem de títulos negativos e de títulos abaixo do considerado protetor em todos os grupos de cães vacinados, a qualidade das vacinas para cinomose deve ser reavaliada.

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Hertape, por ceder o isolado Snyder Hill do vírus da cinomose, utilizado nos testes de soroneutralização.

## REFERÊNCIAS

- Appel MJG & Robson DS (1973). A microneutralization test for canine distemper virus. *American Journal of Veterinary Research*, 34:1460-63.
- Appel MJG (1969). Pathogenesis of canine distemper. *American Journal Veterinary Research*, 30:1167-82.
- Biazzono L, Hagiwara MK & Corrêa AR (2001). Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38:245-50.
- Coyne MJ (2000). Seroconversion of puppies to canine parvovirus and canine distemper virus. A comparison of two combination vaccine. *Journal of American Animal Hospital Association*, 36:137-142.
- Davies DH & Pidford S (1991). Vaccination of dogs with multi-component vaccines. *Australian Veterinary Journal*, 68:183-4.
- Dezengrini R (2005). Anticorpos contra o vírus da cinomose, parvovírus, e adenovírus canino em cães não vacinados de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. In: Seminários PPGMV, Universidade Federal de Santa Maria (<http://coralx.ufsm.br/ppgm/semnarios.html>).
- Gouveia AMG, Magalhães HH & Ribeiro AL (1987). Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e distribuição por faixa etária. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 39:539-45.
- Greene C E & Appel M J (1998). Canine distemper. In: *Infectious disease of the dog and cat*. Philadelphia, W. B. Saunders. p.9-22.
- Greene CE (1990). Immunoprophylaxis and immunotherapy. In: Greene CE (Ed.) *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia, W.B. Saunders. p.21-54.
- Kim D, Ahn S, Jeoung S, Hwang J & Pak S (2004). Serological response of puppies to the selected canine vaccines and vaccination schedules against canine distemper virus. *Journal Veterinary Clinical*, 21:87-92.
- Mccaw DL, Thompson M, Tate D, Bonderer A & Chen Y (1998). Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. *Journal of Veterinary Medical Association*, 213:72-5.
- Mouzin DE, Lorenzen MJ, Haworth JD & King VL (2004). Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 224:55-60.
- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC & Studdert MJ (1999). Laboratory diagnosis of viral diseases. In: Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC & Studdert MJ (Eds.) *Veterinary Virology*. 3ª ed. N. York, Academic Press. p.193-224.
- Osburn BI & Stott JL (1989). Immune response to vaccination. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, 33:93-109.
- Povey RC (1986). Distemper vaccination of dogs: factors which could cause vaccine failure. *Canadian Veterinary Journal*, 27:321-3.
- Reed LJ & Muench H (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27:493-7.
- Rikula U, Nuotio L & Sihvonon L (2000). Canine distemper virus neutralising antibodies in vaccinated dogs. *The Veterinary Record*, 18:598-603.
- Schultz RD (1995). Are we vaccinating too much? *Journal of American Veterinary Medical Association*, 207:421-5.
- Swango LJ (1997). Moléstias virais caninas. In: Ettinger SJ & Feldman EC (Eds.) *Tratado de Medicina Interna Veterinária - moléstias do cão e do gato*. 4ª ed. São Paulo, Manole. p.573-88.
- Tizard I & Ni Y (1998). Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 213:54-60.
- Webster AC (1975). The adverse effect of environment on the response to distemper vaccination. *Australian Veterinary Journal*, 51:488-90.
- York CJ & Burch GR (1961). Canine distemper immunization. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 138:298-301.