

Efeitos adversos da vacina LEISH-TEC® em cães soronegativos para Leishmaniose Visceral**Adverse effects of LEISH-TEC® vaccine on seronegative dogs for Visceral Leishmaniasis**

DOI:10.34117/bjdv6n7-810

Recebimento dos originais: 08/06/2020

Aceitação para publicação: 29/07/2020

Erica Pereira Matias

Discente do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário São Judas Tadeu-Campus Unimonte

E-mail: ericagja@hotmail.com

Fernanda Fonseca Santos

Médica Veterinária do Centro Médico Veterinário vinculado ao Centro Universitário São Judas Tadeu-Campus Unimonte

E-mail: fernanda.medvet2@gmail.com

Juliana Plácido Guimarães

Coordenadora do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário São Judas Tadeu-Campus Unimonte

E-mail: juliana.guimaraes@usjt.br

Thaís Martins Chucri

Docente do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário São Judas Tadeu-Campus Unimonte

E-mail: thaischucri@uol.com.br

RESUMO

A leishmaniose visceral canina, é uma zoonose de grande importância, alta letalidade e de difícil diagnóstico precoce. Métodos de controle, como a vacina profilática anti-LVC, tem sido utilizada para prevenção da doença no país. A Leish-Tec®, é a vacina licenciada pelo MAPA, porém, apresenta em alguns casos reações adversas, como apatia, dor no local da aplicação, tremores musculares, entre outros. Por esse motivo, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos adversos da vacina Leish-Tec® em 29 animais, de ambos os sexos, de diferente faixa etária e raça, que realizaram teste diagnóstico, conforme o protocolo exigido pelo Ministério da Saúde de triagem da doença, e apresentaram-se negativos. Pode-se observar que do total dos animais estudados, um animal (3,4%) não apresentou alterações no período da primovacinação, já, os demais (96,6%) apresentaram algum tipo de reação, principalmente, os animais de raças pequenas. Desta forma, concluímos que mais estudos em relação aos efeitos adversos da vacina se mostram necessários, para sua utilização como método de controle da doença.

Palavras-chave: Calazar, Anticorpos, Imunização

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis is a zoonosis of great relevance, of high lethality and difficult early diagnosis. Control methods, such as prophylactic anti-CVL vaccine, have been used to prevent the disease in the country. Leish-Tec®, is the Mapa-licensed vaccine, but in some cases it has several adverse effects such as apathy, pain at the site of application, tremors, among others. For this reason, this study aimed to evaluate the adverse effects of the Leish-Tec® vaccine in 29 animals, of both sexes, of different aged and breed, who underwent serological analysis, according to the required protocol by the Ministry of Health the result was negative. It could be observed that from the total of the studied animals, only one animal (3.4%) did not present alterations in the primovaccination period, whereas the others (96.6%) presented some kind of reaction, mainly the small breed animals. Thus, further studies regarding the side effects or the vaccine it is necessary to reach the collective.

Keywords: Calazar, Antibodies, Immunization.

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral canina (LVC), também conhecida como Calazar (Kala-zar), é a uma doença sistêmica e zoonótica de grande relevância na medicina veterinária, devido as consequências decorrentes das complicações associadas, por sua letalidade e, porque muitos animais não apresentam sinais clínicos da doença, dificultando assim um diagnóstico precoce (MAIA; CAMPINO, 2008; QUEIROZ et al., 2010). É causada por um parasita protozoário digenético, obrigatoriamente intracelular, pertencente à família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*, e tem seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado (MURPHY et al., 2005; OMS, 2019).

Considerada uma doença negligenciada no Brasil e em alguns países do mundo, sua alta incidência era característica de áreas rurais, mas atualmente vem se expandindo por várias áreas urbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O diagnóstico clínico da LVC é bastante complexo, em torno de 60% a 80% dos animais acometidos são assintomáticos e, podem permanecer sem sintomatologia por longos períodos (MAIA; CAMPINO, 2008; QUEIROZ et al., 2010). No entanto, mesmo sendo assintomáticos, podem transmitir o parasito para flebotomíneos e, conseqüentemente, transmitir a doença (ALVAR et al., 1994; MOLINA, 1994; ABRANCHES et al., 1998).

Quando o animal apresenta os sinais patognomônicos da LVC, é possível observar: alterações cutâneas (alopecia local ou generalizada, dermatite esfoliativa e ulcerações crostrosas que em geral se apresentam na face, orelhas e nas extremidades), linfadenomegalia local ou generalizada, onicogribose, esplenomegalia, hepatomegalia, perda de peso, apatia, hemorragia e distúrbios oculares (BRANDONISIO et al., 1992; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; MAIA E CAMPINO, 2008).

De acordo com Silva (2015), o Ministério da Saúde, recomenda como protocolo para diagnóstico da doença, a utilização do teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina (Biomanguinhos) para triagem e, posteriormente, realizar a confirmação dos positivos por meio do ELISA (Biomanguinhos), entretanto, alguns outros kits comerciais também podem ser utilizados.

Em 2016, uma nova droga baseada em miltefosina (Milteforan® Virbac) teve seu registro autorizado na nota técnica conjunta nº001/2016 – MAPA/MS para o uso veterinário, no tratamento de LVC (ARAÚJO et al., 2018). Tem elevada atividade leishmanicida, interferindo no metabolismo fofolipídico na membrana celular, inibe o crescimento das formas promastigotas e provoca a morte das formas amastigotas (VISCHER, 2007). Porém, o tratamento da doença tem elevado custo, e só pode ser iniciado após o médico veterinário analisar a condição da saúde do animal, através de detalhado exame clínico e laboratorial, pois estão diretamente ligados aos critérios de tratamento e sua viabilidade, e é de extrema importância a fiel participação do proprietário (RIBEIRO, 2001; LAMOTHE, 1999).

No Brasil, as campanhas de controle LV, iniciou-se na década de 50 onde era baseada em tríade, ou seja, controle de vetores, controle de reservatórios e tratamento dos casos humanos (MAGALHÃES et al., 1980). A vacinação dos cães, é uma das formas utilizadas para reduzir a incidência da doença no Brasil. Este método de controle, bloqueia a transmissão do agente para outros animais e o homem, desde que o protocolo de vacinação seja seguido adequadamente. No entanto, há uma preocupação para que não ocorra a interferência nos testes de triagem, ou seja, no reconhecimento de animais naturalmente infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; FERNANDES et al., 2008).

A vacina LeishTec®, é a única licenciada pelo MAPA no Brasil para imunização de cães contra o protozoário, sendo capaz de proteger de 92% a 96% dos animais vacinados (BORJA-CABRERA, 2002). É uma vacina que produz anticorpos específicos, contra o antígeno vacinal, que não reagem com o extrato bruto ou solúvel das formas promastigotas de Leishmania, a base de proteína recombinante e saponina como adjuvante. Com isso, torna-se possível diferenciar animais vacinados com Leish-Tec® dos animais infectados pelo parasita, quando empregado testes sorológicos convencionais, os quais utilizam os antígenos de formas promastigotas de Leishmania (SILVA, 2015). Os cães vacinados expressam resposta imune celular, caracterizada pela indução de níveis elevados de IFN- γ , e humoral. (COELHO et al., 2003; FERNANDES et al., 2008).

Segundo o fabricante, por se tratar de um produto biológico, podem ocorrer manifestações clínicas oriundas de reações de hipersensibilidade, que deverão ser imediatamente tratadas de acordo com a orientação de um médico veterinário. Sendo elas manifestações transitórias no local

da aplicação, particularmente: dor, pápula/ nódulo, edema, alteração da coloração da pelagem, e hipotricose/alopecia. Ainda mais incomuns, podem ocorrer alterações sistêmicas, tais como: apatia/prostração (geralmente pela dor no local da aplicação), febre e, raramente, êmese, diarreia, angioedema, ou até anafilaxia (HERTAPE, 2008).

Devido ao exposto acima, este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência dos efeitos adversos em animais atendidos e vacinados em um Hospital Veterinário em Santos/SP, nas três etapas da primovacinação da anti-LVC Leish-Tec®.

2 MATERIAL E MÉTODO

Neste trabalho foram utilizados 29 animais, sendo 14 machos e 15 fêmeas, 23 castrados e 6 inteiros, que realizaram a primovacinação com anti-LVC Leish-Tec® (laboratório Bio-Manguinho). Devido ao número de animais, os mesmos foram divididos em três grupos de acordo faixa etária, G1- de quatro meses a um ano e 11 meses (n=7); G2- 2 a 7 anos e 11 meses (n=16); e, o G3 animais acima de 8 anos (n=6).

Todos os animais, passaram pelo processo de triagem da doença, com o auxílio do teste de imunoenensaio cromatográfico Dual Path Platform (DPP®/Bio-Manguinho), conforme as recomendações do Ministério da Saúde, onde exige que os animais realizem análise sorológica para constatar a negatividade da LVC.

Foi realizado o protocolo de primovacinação preconizado pelo fabricante, sendo ele, três doses da vacina, com intervalos de 21 dias entre as doses, e com o limite de sete dias de atraso, por via subcutânea. Após cada aplicação, foi questionado ao tutor os efeitos adversos apresentados pelos animais, e, na última dose, informado ao responsável a data para o reforço anual, um ano após a data da primeira dose da primovacinação.

3 RESULTADOS

Do total de cães que participaram deste estudo, somente um animal (3,45%), fêmea, da raça Yorkshire, o proprietário optou em não completar o protocolo vacinal, devido reações causadas nas duas primeiras doses, sendo a de maior intensidade, prostração e febre.

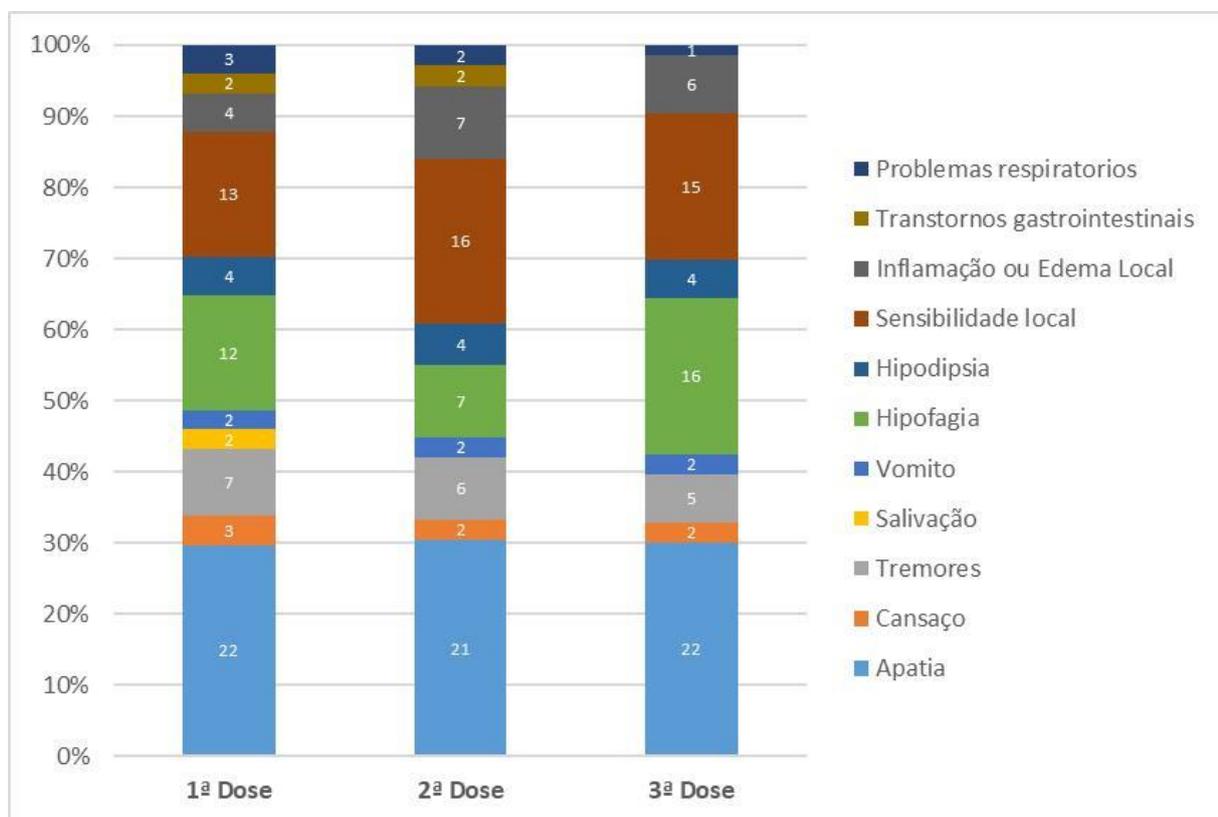
Dos animais estudados, 14 (48,3%) eram machos e 15 fêmeas (51,7%), sendo seis (20,68%) de porte mini, onze (37,93%) de pequeno porte, quatro (17,79%) médio e oito (27,58%) de grande porte e, quanto à raça, 12 (41,4%) eram SRD (Sem Raça Definida) e 17 (58,6%) de raça definida

Todos os animais após as vacinas aguardaram 20 minutos no local, posteriormente, foram observados pelos seus proprietários e os mesmos relataram as reações pós vacinais, onde notou-se

que somente um cão, do sexo feminino, sem raça definida (3,45%), não apresentou efeitos adversos a vacina, em nenhuma das três doses.

Em relação as reações vacinais, apatia (30,09%), sensibilidade ao local (20,37%), hipofagia (16,20%), tremores (8,33%) e edema no local da aplicação/alopecia (7,87%), foram as mais relatadas pelos tutores. Quando comparada as três aplicações, observou-se um pequeno decréscimo no número de reações pós vacina da primeira 74 (34,26%), para a segunda dose 69 (31,94%), sendo na terceira dose o número de reações semelhante a primeira, embora, um animal não ter realizado a última dose da vacinação 73 (33,80%) (Fig. 1).

Figura 1: Reações adversas apresentadas por cada aplicação



No que se refere ao sexo, as fêmeas apresentaram nas três etapas 125 (57,87%) efeitos adversos a vacinação, enquanto que os machos apresentaram 91 (42,13%). Na classificação em relação ao porte dos animais, observou-se que os animais mini, pequeno, médio e grande porte, tiveram em média 9,6 (31,85%); 7,8 (25,76%); 7,75 (25,53%) e 5,12 (16,86%) alterações por animal, em ordem, e, 28 (96,5) eram castrados e, um (3,45%), eram sexualmente inteiros. Já, no quesito idade, foi observado que o G1(7 animais) obteve 64(29,63%), G2 (18 animais) 118(54,63%) e G3 (4 animais) 34 (15,74%) reações.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou a vacina Leish-Tec®, por ser a recomendada pelo Ministério da Saúde/Brasil nas campanhas de controle nacional e, atualmente, é uma alternativa para combater a crescente expansão da LVC. Entretanto, segundo o fabricante os tutores devem ser orientados ao uso associado de outros métodos de controle, como o uso de coleira inseticida, que tem a função de espantar o vetor, para então, diminuir o risco dos animais serem acometidos pela doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; HERTAPE, 2008; CORTEGIANO; CHUCRI, 2020). Portanto, nenhuma vacina é totalmente eficiente e efetiva contra doenças infecciosas ou completamente livre de riscos relacionados a eventos adversos (TIZARD, 2014), como também a incidência dos efeitos colaterais pós-vacinais pode não estar relacionado isoladamente a vacinação (WOLF, 2010).

Somente um cão não apresentou reação adversa, em nenhuma das três etapas da vacinação e, um tutor, não concluiu o protocolo vacinal em seu cão devido as reações causadas nas duas primeiras doses, notando-se assim, a importância apresentada pelo regulamento técnico para pesquisa, desenvolvimento, produção, avaliação, registro e renovação de licenças, comercialização e uso de vacina contra a leishmaniose visceral canina, onde determina que se faz necessário a vigilância e pesquisa pós registro do produto (SILVA, 2015). Um outro estudo feito em Indiana, nos EUA, em uma população de mais de 1 milhão de cães, mostrou que nos 3 primeiros dias após a aplicação da vacina, 38,2 a cada 10.000 cães apresentaram reações, sendo que 72,8% ocorreram no mesmo dia da administração da vacina; 31,7% foram consideradas reações alérgicas; e 65,8% foram considerados “reações à vacina”, provavelmente devidas à toxicidade da vacina (TIZARD, 2014)

Quando comparado os efeitos adversos da primovacinação, houve um pequeno decréscimo no número de reações da primeira 74 (34,26%) para a segunda dose 69 (31,94%), sendo na terceira o número de reações semelhante a primeira 73 (33,80%) doses), contabilizando 216 (100%) reações. Nas três etapas, 28 animais (96,55%), apresentaram algum efeito adverso, sendo assim, nota-se em nosso estudo um número alto de reações comparando com as notificadas pelo Programa de Notificação de médicos veterinários da farmacopeia dos Estados Unidos, referente as alterações pós-vacinais relatadas durante um ano (1997 a 1998), onde houveram 460 notificações relacionadas as reações adversas das vacinas e, a média o número de efeitos adversos em cães e gatos atingiram a incidência de 0,004% /ano (TIZARD, 2002).

Foi verificado também 125 (57,87%) efeitos adversos em fêmeas, um número maior quando comparado aos machos 91 (42,13%), porém o manual do fabricante da vacina Leish-Tec, não relata essa segregação, apenas alerta que pode ocorrer alterações no quesito eficácia da vacina, em fêmeas, quando vacinadas no período do cio ou quando lactantes (HERTAPE, 2008), entretanto, segundo

Tizard (2002), nos machos a ocorrência normalmente é de forma temporária, já nas fêmeas os cuidados devem ocorrer devido ao risco de abortamento.

Moore e colaboradores (2005), relatam que os cães de pequeno porte apresentam maior risco de reações vacinais em comparação aos de grande porte, corroborando com nosso trabalho, que apresentou 25,76% pequeno e 16,86% grande porte. Também, relata que os animais esterilizados correm maior risco em comparação aos indivíduos não esterilizados, resultado também encontrado em nossos achados, uma vez que dos 29 animais, 28 (96,55%), apresentaram reações, entretanto, o único animal que não apresentou reação nas três doses era castrado.

Referente a idade, a segregação em grupos mostrou que o G1 (41,21%) apresentou em média mais efeitos adversos comparado ao G2 (33,23%) e G3 (25,56%), trazendo menos preocupações ao estudo, pois conforme pesquisadores, recomenda-se cautela com os animais idosos, debilitados, com doenças alérgicas ou qualquer forma imunomediada ou crônica, já que a estimulação do sistema imune pode intensificar tais condições (NELSON; COUTO, 2010; TIZARD, 2014).

Estudos utilizando a saponina como adjuvante, componente também encontrado na Leish-Tec®, relataram a presença de efeitos adversos em cães, como apatia, perda de pelos no local do inóculo, anorexia, vômito e diarreia (SANTOS et al., 2002; PARRA et al., 2007; RAJPUT et al., 2007), corroborando com nossos achados, onde, apatia (30,09%), sensibilidade local (20,37%), hipofagia (16,20%), tremores (8,33%) e edema no local da aplicação/alopecia (7,87%), foram as mais relatadas. Outros autores também relatam, como efeitos adversos comumente encontrados, mal-estar, letargia, febre, inapetência e dor no local da aplicação, sendo eles, eventos considerados benignos e em geral transitórios (WOLF, 2010). Contudo, pode ocorrer toxicidade ou reação de hipersensibilidade associada (DAY et al., 2016), que segundo Tizard (2002), reações de hipersensibilidade, consideradas excessivas ou inadequadas, é mais frequentemente encontrada nas raças pequenas, corroborando com nossa pesquisa, onde os cães de pequeno porte foram os que mais apresentaram reações pós-vacinal, de maior intensidade, no local da aplicação e causando alopecia, quando comparado aos animais de médio e grande porte.

5 CONCLUSÃO

A Leishmaniose visceral canina, é uma zoonose de grande relevância para a saúde pública, e a vacina, juntamente com o uso de coleiras inseticidas, pode auxiliar na proteção dos animais contra a doença. Em nosso estudo, um grande número de animais apresentou efeitos adversos após a vacinação. Sendo assim, concluímos que pesquisas em relação aos componentes da vacina, que podem ser os responsáveis pelas as reações adversas causadas aos cães, bem como o seu custo, por

ser a única autorizada no Brasil, deveriam ser melhores explorados, objetivando maior eficácia com menos efeitos adversos, para seu uso ao controle coletivo.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.M.; Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. **Acta Med Port.**, Oct,v.10, p.871-5, 1998.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v 88, p.371- 378, 1994.

ARAUJO, C. M. C.; COSTA, A. S.; RISSO, J. M. R.; Uso da miltefosina como terapia combinada em leishmaniose visceral canina – relato de caso. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.15 n.27, 2018.

BORJA-CABRERA, G.P. et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quil-A saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine** , v.20, p. 3277-84, 2002.

BRANDONISIO, O.; CARELLI, G.; CECI, L.; CONSENTI, B.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). **Eur J Epidemiol.**, Mar, v. 8, n. 2, p.273-6, 1992.

COELHO E. A. et al. Immune responses induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. **Infect Immun**, Jul, v.71, n.7, p.3988-94, 2003.

CORTEGIANO, B.M.; CHUCRI, T.M Prevalência da leishmaniose visceral canina no Hovet Unimes em Santos-SP. **Rev Braz J of Develop**, Curitiba, v. 6, n. 7, p. 48594-48602 jul. 2020.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.V. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, May-Jun, v.48, n.3, p.151-6. 2006.

DAY, M. J.; HORZINEK, M.C.; SCHULTZ, R. D. Diretrizes para a vacinação de cães e gatos. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, 2016.

FERNANDES, A.P. et al. Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, Oct., v.29, n.26(46), p.5888-95, 2008.

HERTAPE, C.; FERNANDES, A. P. GAZZINELLI, R. T. **Manual Técnico da vacina Leish-Tec®**. 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, II INFORME TÉCNICO: Leishmaniose visceral americana. **Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo**, ed. MS, p.13-14, 2003.

MURPHY, G.F. et al. **Patologia: Bases patológicas das Doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 1283-1330, 2005.

LAMOTHE, J. Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to Z (Zylorick). In canine Leishmaniasis: an update. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**, Barcelona, Espanha, 1999.

MAGALHÃES, P. A. et al. Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais área. Results of prophylactic measures. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.22, p.197-202, 1980.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol.**, Dec; v.158, n.4, p.274-87, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). **Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, JulAug, v.88, n.4, p.491-3, 1994.

MOORE, G. E. et al. Adverse events diagnosed within three days of vaccine administration in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 7, p. 1102-1108, 2005.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: SAUNDERS ELSEVIER, p. 1504, 2010

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmanioses, Informe Epidemiológico das Américas**. *Informe de Leishmaniose n°7*, março, 2019.

PARRA, L.E. et al. Safety Trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v.25, p.2180-2186, 2007.

QUEIROZ, N.M. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISAtest. **Rev Bras Parasitol Vet.**, Jan-Mar, v.19, n.1, p.32-8, 2010.

RAJPUT, Z.I.; HU, S.H.; XIAO, C.W.; ARIJO, A.G. Adjuvant effects of saponins on animal immune response. **J. Zhejiang. Univ. Sci.**, v.B8, p. 153-161, 2007.

RIBEIRO, V. M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal – Ver. Cient.Fac.Vet. Univ. Fed. Ceará**, v.10, n.3, p.13-19, 2001.

SANTOS, W.R.; LIMA, V.M.F.; SOUZA, E.P. Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.21, p.30-43, 2002.

SILVA R. S. **Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com Leish-Tec® (Hertape Saúde Animal S/A) para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae)**. 2015. 85 f. Pós-graduação (tese) – Ciências da saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária - uma introdução**. 6.ed. São Paulo: ROCA, 532p. 2002.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. 9.ed. Rio de Janeiro: SAUNDERS ELSEVIER, 2014.

VISCHER, C. Milteforan, the new generation in the management of canine leishmaniosis. **MILTEFORAN WORKSHOP**, Virbac S.A., Portugal. 2007.

WOLF, A. M. Canine and feline vaccination: protocols, products, and problems. In: **PENN ANNUAL CONFERENCE**, 110. 2010, Philadelphia, Pennsylvania. Proceedings... Philadelphia: Penn Veterinary Medicine, 2010. p. 16-29.