

Ernani Ibirá Gonçalves

UTILIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS ADULTOS E LACTENTES NA
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA VACINA ANTIAFTOSA.

FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA
EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Tese apresentada à Escola de
Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais, pa-
ra obtenção de grau de Mes-
tre em Medicina Veterinária.
Área: Epidemiologia.

Belo Horizonte

1980

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação


UTILIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS ADULTOS E LACTENTES NA
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA VACINA ANTIAFTOSA.

Ernani Ibirá Gonçalves

Belo Horizonte

1980

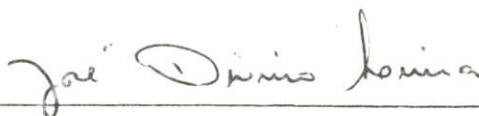
Aprovada em 29/12/1980



PROF. ELVIO CARLOS MOREIRA
Orientador



PROF. FRANCISCO CECÍLIO VIANA



PROF. JOSÉ DIVINO LIMA

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e professor Élvio Carlos Moreira, orientador;

Aos professores Francisco Cecílio Viana, José Divino Lima e José Angelis Côrtes pelas sugestões;

Aos colegas Gonçala Maria Martins Arita, Hiromi Arita, Erberto Diniz Barbosa e Laudemilia Maria de Mello Cavallari, pelo auxílio na execução dos trabalhos;

Aos colegas Ossamuro Umehara e Roberto Appolaro dos Laboratórios Wellcome do Brasil;

Ao Sr. Roberto Batista da Silveira pelo fornecimento dos camundongos;

Aos demais colegas e auxiliares que tornaram possível a elaboração desta trabalho;

À Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva, pela impressão da tese;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro ao curso de Epidemiologia,

nossos mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Foi desenvolvido um método de avaliação de eficiência de vacinas antiaftosas em camundongos recém-nascidos, filhos de mães vacinadas. Para isso usou-se um índice, denominado Índice de Proteção Camundongos (IPC), resultante do quociente entre o título do vírus em camundongos filhos de mães não vacinadas sobre o título em camundongos filhos de mães vacinadas (T/V). Foi verificado que existe variação nos resultados dos índices e que, para reduzir esta variação a níveis aceitáveis, é necessário que sejam usadas, na titulação, 6 ou mais ninhadas por diluição de vírus. Foi também determinado que há correlação entre a quantidade de vacina inoculada e o valor do IPC.

SUMMARY

An efficiency evaluation method of the Foot-and-Mouth Disease vaccine was developed using mice. The seven day-old offsprings obtained from mothers vaccinated with monovalent "O" vaccine were titrated with homologous virus. The quotient between the titre found in suckling mice of unvaccinated mothers (control) and the titre of the mice of the vaccinated mothers determine an index known as "Mice Protection Index". This value permit a comparative proof of the test. When diverse quantitative broods of mice was used concomitantly in repetition, it was observed that variation exists in the results, and it is necessary to use a minimum of six broods in order to reduce the variation on acceptable level and to permit a repetibility of the test. It was even verified that there is correlation between the value of the Mice Protection Index and the quantity of the vaccine inoculated in the mice.

SUMÁRIO

	Pag.
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3. RESULTADOS.....	10
4. DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÕES.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

LISTA DE TABELAS

	Pag.
TABELA I - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de fêmeas submetidas ao tratamento A (tes _{temunho}).....	11
TABELA II - Titulações do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de fêmeas submetidas ao tratamento B.....	13
TABELA III - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando empregado um grupo por diluição de vírus.....	15
TABELA IV - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram dois grupos por diluição de vírus.....	16
TABELA V - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram quatro grupos por diluição de vírus.....	17

TABELA VI	- Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram seis grupos por diluição de vírus.....	18
TABELA VII	- Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram oito grupos por diluição de vírus.....	19
TABELA VIII	- Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram 12 grupos por diluição de vírus.....	20
TABELA IX	- Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram 16 grupos por diluição de vírus.....	21
TABELA X	- Indicadores obtidos a partir dos Índices de Proteção Camundongos, quando se usaram diversas quantidades de grupos por diluição de vírus, no tratamento B.....	22
TABELA XI	- Significância da diferença entre os desvios padrão obtidos, quando foram usadas diversas quantidades de grupos por diluição de vírus, no tratamento B..	24
TABELA XII	- Resultados das 6 repetições da prova de Índice de Proteção Camundongos, usando-se vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos submetidos aos tratamentos C,D,E,F e G e alguns indicadores estatísticos.....	25

LISTA DE GRÁFICOS

	Pag.
GRÁFICO 1 - Dispersão do Índice de Proteção Camundongos das 26 repetições de cada prova, com diversos números de grupos por diluição de vírus no tratamento B, a média dos índices médios e a variação de ± 2 desvios padrão.....	23
GRÁFICO 2 - Dispersão dos Índices de Proteção Camundongos em cada tratamento, os pontos médios, a reta de regressão (\bar{y}_c) e ± 2 desvios padrão a partir de \bar{y}_c	27

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Desde as primeiras tentativas de produção de vacinas contra Febre Aftosa, ficou patente a dificuldade de avaliar-se a eficiência destas.

Pela descrição em MANNINGER & MOCSY (1968), sente-se esta dificuldade a partir da primeira vacina apresentada por VALLEÉ, CARRÉ e RINJARD, em 1926, que era constituída por vírus inativado por formol. Testada em cobaios por GELORMY & HARISPE, por WALDMANN, KOBE e PYL e por RICHARD, SKOMOROHOF e MIROTVORSKIJ, foi considerada eficiente. Entretanto, testes em bovinos levados a efeito por LAVROVSKIJ & LIPATOV e por WALDMANN, KOBE e PYL em 1937, demonstraram sua ineficiência. Ainda conforme MANNINGER & MOCSY (1968), SCHMIDT, em 1938, produziu uma vacina em que o vírus obtido em cobaios era adsorvido por hidróxido de alumínio e inativado por formol e calor. Testada em cobaios, foi classificada como boa, mas ao ser testada em bovinos por SCHMIDT & TOUSSENG e por WALDMANN & KOBE, mostrou-se ineficaz. A vacina de WALDMANN & KOBE produzida em 1938, usando a técnica de SCHMIDT, mas utilizando vírus oriundo de lesões de bovinos, foi testada somente em bovinos e com ótimos resultados.

Testes controlados de eficiência, entretanto, só foram possíveis após o advento da titulação do vírus de Fe-

bre Aftosa em língua de bovinos por HENDERSON & GALLOWAY (1953). Bovinos são inoculados com o vírus em diversas diluições, por via intradérmica na língua. O desenvolvimento de vesículas nos pontos de inoculação determina o título do vírus. Desta maneira, por comparação, pode-se avaliar a imunidade provocada por uma vacina e, por conseguinte, sua eficiência.

Desde as primeiras tentativas, os pesquisadores têm procurado encontrar um teste de eficiência para as vacinas antiaftosas.

Em 1953, SKINNER, que em 1951 havia demonstrado a suscetibilidade do camundongo recém-nascido ao vírus da Febre Aftosa, sugeriu o uso deste animal na avaliação da imunidade.

BODON (1955) descreveu um método de avaliação de anticorpos por imunoprecipitação.

CUNHA et alii (1957) mostraram que o camundongo pode ser utilizado para verificação de anticorpos séricos de bovinos, adotando o "Índice de soroproteção", em que camundongos neonatos são inoculados com os soros a serem verificados e em seguida inoculados com diversas diluições de vírus. O quociente entre os títulos dos controles e dos inoculados com o soro é o índice.

ROSEMBUSCH & CARDARELLI (1957) descreveram uma técnica em cobaias, na qual, vacinando-os com diversas doses de vacina e agredindo-os com dose fixa de vírus, determina-se a "Dose Protetora 50%".

LUCAM & FÉDIDA (1958) desenvolveram um índice, que denominaram "K", para medir a imunidade em bovinos. Esse índice consiste no quociente dos títulos em bovinos controles e em vacinados, quando inoculados com vírus em diversas diluições.

UHLMANN & TRAUB (1958) descreveram um método para

medição de eficiência da vacina em camundongos adultos, verificando a presença da infecção, por uma viremia.

CUNHA (1960) adaptou o vírus da Febre Aftosa a camundongos adultos e propôs seu uso para avaliação da vacina.

BULOW (1962) demonstrou que é possível verificar a eficiência da vacina, a partir do fato verificado pelo mesmo autor (1962 a) de que anticorpos neutralizantes são transmitidos da mãe aos filhos pela placenta e pelo leite. Como os camundongos adultos não apresentam a doença clinicamente e como a vacinação não produz efeitos em camundongos recém-nascidos, que são susceptíveis ao vírus da Febre Aftosa, esse autor vacinou camundongas adultas e fez agressão com vírus nos filhotes destas fêmeas, verificando a formação de anticorpos da mãe por intermédio dos filhotes.

LUCAM et alii (1962) desenvolveram o Índice "P" para testar eficiência de vacinas em suínos. Esse teste é semelhante ao Índice "K", usando-se, entretanto, suínos.

DAVIES et alii (1963) descreveram um método de avaliação em que pintos são vacinados e posteriormente os anticorpos são determinados por meio de soroneutralização em cultivo celular (colour test).

LUCAM et alii (1964), usando cobaias para verificação de eficiência, criaram o Índice "C". Esse teste consiste em inocular vírus em diversas diluições, em um grupo controle e em um outro grupo previamente vacinado. O quociente desses títulos determina o índice.

Os mesmos autores (1964 a) descreveram outro índice, o Índice "S", que é uma soroneutralização em cultivos celulares, no qual o índice é dado pelo quociente das titulações do vírus em tubos de cultura celular sem soro e em tubos com o soro bovino a ser testado.

FONTAINE et alii (1966) propuseram o Índice "M"

para medir a eficiência de vacinas, consistindo em prova semelhante ao Índice "K", mas usando-se ovinos.

TRAUB & BECHMANN (1969), BECHMANN (1970), TRAUB et alii (1970) e TRAUB et alii (1970 a) desenvolveram um teste em que a imunidade produzida pela vacinação de camundongos adultos é verificada por Reação de Fixação de Complemento dos soros dos camundongos.

SOLYOM & DEAK (1975) criaram o Índice "E" em camundongos adultos, utilizando a técnica descrita por CUNHA (1960).

Dos métodos propostos, os que usam bovinos necessitam que estes animais sejam "virgens" ao vírus de Febre Aftosa, o que em nosso país é uma condição limitante.

Dentre os demais métodos, indiretos, os de mais fácil execução seriam os que usassem camundongos.

Dentre essas, as técnicas que utilizam soro de bovinos, demandam mais uma operação, qual seja: a sangria destes animais.

Entre os sistemas que usam a vacinação de camundongos adultos, o que utiliza a Reação de Fixação de Complemento necessita que os camundongos sejam sangrados um a um.

O que utiliza a verificação da infecção por uma viremia é de extrema subjetividade.

Os demais métodos necessitam que o vírus seja adaptado aos camundongos adultos, com a possibilidade de modificar as características do vírus.

A técnica proposta por BULOW (1962), em que se verifica a proteção induzida pela vacina em camundongos neonatos, filhos de mães vacinadas, não tem os inconvenientes das demais. O desenvolvimento de um teste dessa natureza propiciaria pesquisas e estudos de vacinas, quando são necessárias grandes quantidades de testes.

O presente trabalho procura desenvolver este método

do, com os seguintes objetivos:

1) Em uma primeira fase, procurou-se tornar o método quantitativo, já que BULOW (1962) não apresentou valores numéricos capazes de serem comparados. Será usado para tanto, um índice como os descritos por CUNHA et alii (1957) (Índice de soroproteção), LUCAM & FÉDIDA (1958) (Índice K), LUCAM et alii (1962) (Índice P), LUCAM et alii (1964) (Índice C), LUCAM et alii (1964 a) (Índice S), FONTAINE et alii (1966) (Índice M) e SOLYOM & DEAK (1975) (Índice E).

Esse índice, denominado "Índice de Proteção Camundongos" (IPC), consiste no quociente entre os títulos dos vírus em camundongos filhos de mães não vacinadas (testemunhos) e filhos de mães vacinadas.

2) Verificar a variabilidade dos resultados do "Índice de Proteção Camundongos" e o menor número de camundongos a ser usado por teste, para que a variação seja aceitável.

3) Em uma segunda fase do trabalho, verificar se concentrações diferentes da vacina provocam resultados diferentes e se existe correlação entre as concentrações da vacina e os valores dos Índices de Proteção Camundongos.

BULOW (1962) afirma que existe a correlação, sem, entretanto, apresentar uma análise estatística que comprove tal afirmativa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Camundongos

Foram utilizados camundongos suíços albinos, originários do Animal Research Institute, Pirbright e criados no Laboratório Regional de Apoio à Área Animal, do Ministério da Agricultura em Campinas, Estado de São Paulo. Os camundongos adultos foram utilizados com 75 a 80 dias de idade e os lactentes com 7 dias.

Cada mãe com os respectivos filhotes formaram um grupo. Estes grupos constituíram-se em média por 9,23 filhotes por fêmea, sendo que 50% dos grupos utilizados continham 10 filhotes por fêmea, 23% tiveram 9 filhotes por fêmea, 14% com 8 filhotes por fêmea, 7% com 7 filhotes, 4% com 6 filhotes, 1% com 5 filhotes e 0,6% com 4.

2.2. Vacina

A vacina antiaftosa usada foi produzida com vírus tio "O" Valleé, inativado por Acetiletileneimina (AEI) e adsorvido em hidróxido de alumínio.

Envasada em frascos de 200 ml, foi armazenada à temperatura de 4°C até o momento do uso. Quando indicado,

imediatamente antes do uso, foi submetida a diluições em progressão geométrica de razão dois.

As inoculações da vacina foram feitas pela via subcutânea, na dose de 0,5 ml por camundonga.

2.3. Vírus

Foi empregada uma suspensão de vírus de Febre Afetosa tipo "0" Valleé, subtipo "O₁" Campos. O vírus foi replicado em linhagem de células BHK 21. A mesma suspensão foi utilizada tanto na produção de vacina como no preparo do inóculo para a agressão aos camundongos. O vírus para inoculação foi distribuído em alíquotas de 5 ml e mantido a - 40°C até o momento do uso. Imediatamente antes do uso, o vírus foi submetido a diluições decimais até 10^{-7} e cada diluição, inoculada nos camundongos lactentes pela via intraperitoneal, na dose de 0,05 ml por animal.

2.4. Diluente

Solução salina isotônica tamponada com fosfatos para pH 7,4 a 7,6. O mesmo diluente foi usado na diluição da vacina, do vírus e na inoculação dos controles.

2.5. Título

Os títulos do vírus foram calculados pelo método de REED & MUENCH (1938) e indicam a Dose Letal 50%, expressos em logaritmo de base 10.

2.6. Procedimentos

2.6.1. Primeira Fase: nessa fase, as fêmeas adultas foram inicialmente alocadas em dois lotes destinados a receber os tratamentos A e B.

2.6.1.1. Tratamento A

As fêmeas desse lote foram inoculadas com diluente, segundo a dose e via já apontadas.

Três dias após a inoculação, foram acasaladas com machos de mesma idade, sendo, posteriormente, as gestantes separadas em gaiolas individuais, para constituírem, após a parição, juntamente com seus filhotes, os grupos destinados à titulação do vírus.

Foram feitas neste tratamento, 26 repetições da titulação.

2.6.1.2. Tratamento B

As camundongas desse lote foram inoculadas com vacina sem diluir e foram submetidas à mesma metodologia usada no tratamento A.

Foram feitas 64 repetições da titulação nesse tratamento.

Dos títulos obtidos, procedeu-se ao sorteio, pelo método das repodições, de sete amostras:

Na primeira, foram sorteados, um a um, 26 títulos, que representam 26 titulações, com 1 grupo por diluição de vírus.

Na segunda, sorteados 2 a 2, 26 títulos, que representam 26 titulações com 2 grupos por diluição de vírus.

Nos demais, foram sorteados 26 títulos 4 a 4, 6 a 6, 8 a 8, 12 a 12 e 16 a 16 que representam 26 titulações com 4, 6, 8, 12 e 16 grupos por diluição de vírus, respectivamente.

2.6.2. Segunda fase

Nessa fase foram feitos os tratamentos C, D, E,

F, G e H, obedecendo aos mesmos procedimentos que na fase anterior quanto a dose, via, idade, formação de grupos, com a diferença que foram usados 6 grupos por diluição de vírus e foi usada vacina sem diluir e nas diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 respectivamente nos tratamentos C, D, E, F e G. No tratamento H, as camundongas foram inoculadas com diluente, obtendo-se, dessa maneira, o testemunho.

2.7. Análise estatística

Os cálculos estatísticos utilizados foram baseados em CROXTON & COWDEN (1952) e o nível de probabilidade a dotado, de 5% ($P = 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Primeira fase

3.1.1. Tratamento A

Esse tratamento representou o testemunho para efeito de titulação. O título do vírus encontrado foi de $10^{5,82}$ DL 50% por mililitro.

A TAB. I mostra o número de camundongos neonatos mortos e sobreviventes em cada diluição de vírus nas 26 repetições. Na soma encontrou-se 100% de mortos com o vírus sem diluir, 98% na diluição de vírus 10^{-1} , 93% na diluição 10^{-2} , 97% na diluição 10^{-3} , 70% na 10^{-4} , 30% em 10^{-5} , 10% 10^{-6} e 6% na 10^{-7} .

TABELA I - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de fêmeas submetidas ao tratamento A (testemunho).

Repetição nº	diluição do vírus																
	s/d*		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		
	M*	S*	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	
1	10	0	10	0	8	0	10	0	8	1	6	4	5	5	0	10	
2	10	0	9	0	10	0	10	0	8	0	7	1	2	7	0	9	
3	10	0	10	0	10	0	10	0	6	3	9	0	0	6	0	10	
4	9	0	9	0	9	0	7	0	7	1	4	3	0	10	0	8	
5	8	0	9	0	8	2	9	0	8	2	0	9	0	9	0	10	
6	8	0	10	0	8	1	10	0	6	4	0	9	0	10	0	9	
7	9	0	10	0	10	0	10	0	6	2	0	9	0	8	0	7	
8	10	0	7	3	8	0	10	0	7	2	2	5	1	9	-	-	
9	8	0	10	0	9	0	10	0	8	2	9	1	3	2	0	10	
10	9	0	6	0	4	0	10	0	8	2	1	8	2	8	-	-	
11	8	0	10	0	7	1	9	1	5	4	2	8	0	8	0	9	
12	10	0	8	0	7	2	9	0	5	2	2	5	0	10	0	10	
13	10	0	10	0	9	1	10	0	5	4	6	2	2	8	8	1	
14	10	0	9	0	8	0	6	0	7	3	5	3	5	3	0	8	
15	9	0	7	2	1	7	9	1	7	0	1	6	0	8	0	8	
16	8	1	8	0	9	0	7	1	9	0	1	7	0	9	0	7	
17	10	0	8	0	10	0	10	0	3	5	3	7	0	10	0	8	
18	9	0	10	0	10	0	10	0	9	0	2	7	0	8	0	9	
19	10	0	9	0	10	0	10	0	3	7	1	8	0	8	0	9	
20	10	0	10	0	6	2	10	0	9	0	1	7	0	9	0	9	
21	9	0	10	0	7	0	8	0	6	1	0	8	0	9	0	9	
22	7	0	10	0	8	0	10	0	4	6	1	9	0	9	4	6	
23	9	0	10	0	10	0	8	0	5	5	1	4	0	6	0	5	
24	10	0	10	0	9	0	10	0	4	2	2	7	0	10	0	7	
25	8	0	9	0	9	0	9	0	3	7	0	10	0	7	0	10	
26	10	0	9	0	8	0	7	3	4	4	1	9	0	8	0	10	
Soma	238	1	237	5	212	16	229	6	160	69	67	156	22	204	12	198	
*M = Mortos		*S = Sobreviventes						*s/d= Vírus sem diluir									

3.1.2 Tratamento B

As ninhadas das fêmeas nesse tratamento, foram tituladas e o título das 64 repetições foi de $10^{1,66}$ DL 50% por mililitro.

Na TAB. II estão apresentados o número de camundongos neonatos mortos e sobreviventes em cada diluição de vírus nas diversas repetições.

TABELA II - Titulações do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de fêmeas submetidas ao tratamento B.

Repetição nº	diluição do vírus															
	s/d*		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷	
	M*	S*	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
1	0	10	0	7	1	8	3	6	10	0	0	10	0	9	0	9
2	2	8	0	7	0	6	0	10	1	7	0	10	1	9	0	9
3	1	9	9	0	4	4	0	7	0	8	0	10	0	8	0	10
4	1	9	0	10	0	8	0	7	0	9	0	10	3	6	0	9
5	0	9	7	3	0	6	0	7	0	6	0	5	6	0	0	10
6	2	4	0	9	0	9	2	8	0	5	0	7	0	9	0	7
7	0	8	0	10	0	9	0	10	0	9	0	9	0	7	0	9
8	0	9	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	9
9	0	9	0	9	0	3	0	10	1	9	0	8	0	8	0	9
10	0	6	0	10	10	0	1	9	1	9	1	6	0	8	0	10
11	0	8	0	10	0	9	0	7	0	9	0	10	0	10	0	10
12	0	9	0	10	0	8	7	0	0	8	3	7	0	10	0	10
13	7	3	3	7	1	7	6	1	8	2	0	10	-	-	-	-
14	0	10	0	10	8	0	6	1	5	4	5	4	0	10	0	10
15	9	0	7	3	0	9	5	5	2	6	0	10	-	-	-	-
16	10	0	0	9	4	2	3	3	1	6	0	6	-	-	-	-
17	0	10	0	10	0	9	0	8	7	3	0	10	0	10	1	6
18	10	0	9	0	0	10	1	9	0	10	0	10	0	10	0	10
19	2	4	10	0	0	6	0	10	0	10	0	8	0	9	0	7
20	0	10	0	10	0	8	8	2	0	8	1	9	0	10	0	9
21	0	10	0	8	0	8	0	9	0	8	0	9	1	9	0	9
22	1	9	10	0	0	10	2	8	0	8	0	10	0	10	1	9
23	0	10	0	10	0	10	4	6	0	9	0	8	0	6	0	8
24	7	1	0	9	0	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	7
25	8	2	0	9	0	9	0	8	0	10	0	10	0	8	0	9
26	8	0	0	10	0	9	8	0	0	10	0	10	0	10	0	10
27	0	9	0	10	10	0	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
28	0	10	0	10	0	8	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
29	0	10	0	10	0	10	0	9	0	8	0	8	0	10	0	10
30	10	0	1	9	1	9	9	1	0	8	0	10	0	9	0	8

Repetição	nº	diluição do vírus															
		s/d*		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷	
		M*	S*	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
31		0	10	9	1	0	9	0	10	0	9	0	9	0	8	0	6
32		9	1	0	10	0	10	0	10	0	9	0	9	0	6	0	10
33		0	10	0	9	0	10	1	7	0	10	0	10	0	9	-	-
34		0	10	10	0	0	10	0	10	0	7	0	9	0	10	-	-
35		0	10	10	0	0	7	0	6	0	9	0	10	0	9	-	-
36		0	10	0	10	0	8	0	10	0	10	0	7	0	6	-	-
37		0	10	0	10	0	10	0	9	0	10	0	10	0	10	0	9
38		8	2	0	10	0	10	2	7	0	10	0	10	0	10	0	10
39		5	0	0	10	2	7	0	10	0	10	0	10	0	8	0	7
40		0	9	0	8	0	10	3	5	0	10	0	9	0	8	-	-
41		0	8	10	0	5	0	9	1	0	10	0	9	0	9	-	-
42		10	0	0	9	0	10	1	9	0	6	0	10	0	7	-	-
43		10	0	0	10	0	8	0	9	0	10	0	10	0	10	3	7
44		5	4	0	10	0	10	1	7	0	10	0	10	0	10	0	10
45		9	0	0	9	0	10	0	10	0	10	0	9	0	8	0	7
46		0	10	2	7	0	10	5	5	0	10	0	10	0	10	0	6
47		0	4	0	10	0	9	4	6	0	9	0	8	0	8	-	-
48		10	0	0	10	10	0	0	9	5	3	0	8	0	5	-	-
49		0	9	0	9	0	10	0	10	0	8	0	8	0	10	0	10
50		0	10	0	9	0	9	0	10	0	10	0	9	0	10	2	8
51		0	10	10	0	1	9	7	3	0	10	0	10	0	10	0	10
52		9	0	8	2	0	10	0	10	0	6	2	7	0	9	0	9
53		0	10	0	10	7	3	0	10	1	9	0	10	0	10	0	8
54		0	10	0	9	0	10	9	1	0	9	1	9	0	8	-	-
55		10	0	10	0	0	10	9	1	0	10	0	10	0	8	0	8
56		0	10	0	10	0	10	0	10	3	7	0	9	0	7	0	8
57		10	0	1	8	0	10	0	9	0	9	0	7	0	10	0	4
58		0	10	2	8	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	8
59		1	9	9	0	0	10	0	9	0	10	0	10	0	10	-	-
60		8	2	0	10	0	10	0	9	0	9	0	8	0	10	-	-
61		0	10	0	9	0	10	0	9	0	10	0	10	0	8	0	5
62		10	0	0	10	0	10	0	10	0	9	0	9	0	6	0	4
63		10	0	0	10	0	10	0	8	1	8	0	9	0	8	0	8
64		0	10	0	10	0	10	0	6	6	3	0	9	0	9	-	-

*M = Mortos

*S = Sobreviventes

*s/d = sem diluir

Entre as 64 titulações do tratamento B, foram sorteadas 26 delas com um grupo por diluição de vírus. A TAB. III mostra os títulos obtidos de cada diluição e o respectivo Índice de Proteção Camundongos, ordenados crescentemente, para melhor análise.

TABELA III - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando empregado um grupo por diluição de vírus.

Número de ordem	título/ml*	IPC*
1	0,80	5.02
2	0.80	5.02
3	0.80	5.02
4	0.80	5.02
5	0.80	5.02
6	0.85	4.97
7	0.86	4.96
8	0.90	4.92
9	1.05	4.77
10	1.19	4.63
11	1.24	4.58
12	1.30	4.52
13	1.68	4.14
14	1.68	4.14
15	1.78	4.04
16	1.79	4.03
17	1.80	4.02
18	1.80	4.02
19	1.87	3.95
20	2.08	3.74
21	2.27	3.45
22	2.49	3.33
23	2.56	3.26
24	3.01	2.81
25	3.12	2.70
26	3.24	2.58

*DL 50% em \log_{10}

*Índice de Proteção Camundongos

As 26 representações sorteadas 2 a 2 do tratamento B estão indicadas na TAB. IV, apresentando os títulos encontrados usando-se dois grupos por diluição de vírus. Os títulos foram ordenados crescentemente e indicados os respectivos índices.

TABELA IV - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram dois grupos por diluição de vírus.

Número de ordem	título/ml*	IPC*
1	0.80	5.02
2	0.93	4.89
3	0.96	4.86
4	1.12	4.70
5	1.19	4.63
6	1.23	4.59
7	1.23	4.59
8	1.24	4.58
9	1.24	4.58
10	1.30	4.52
11	1.43	4.45
12	1.48	4.34
13	1.53	4.29
14	1.79	4.03
15	1.83	3.99
16	1.89	3.93
17	1.90	3.92
18	1.93	3.89
19	1.97	3.85
20	2.01	3.81
21	2.07	3.75
22	2.30	3.52
23	2.62	3.20
24	2.98	3.14
25	2.80	3.02
26	3.25	2.57

*DL 50% em \log_{10}

*Índice de Proteção Camundongos

Da mesma maneira que as anteriores, a TAB. V mostra os títulos e índices encontrados com o sorteio 4 a 4 do tratamento B, ordenados crescentemente.

TABELA V - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram quatro grupos por diluição de vírus.

Número de ordem	título/ml*	IPC*
1	1.12	4.70
2	1.18	4.64
3	1.22	4.60
4	1.24	4.58
5	1.26	4.56
6	1.28	4.54
7	1.28	4.54
8	1.30	4.52
9	1.34	4.48
10	1.38	4.44
11	1.43	4.39
12	1.52	4.30
13	1.61	4.21
14	1.71	4.11
15	1.72	4.10
16	1.73	4.09
17	1.81	4.01
18	1.81	4.01
19	1.85	3.97
20	1.90	3.92
21	1.90	3.92
22	1.91	3.91
23	1.92	3.90
24	2.00	3.82
25	2.01	3.81
26	2.01	3.81

*DL 50% em \log_{10}

*Índice de Proteção Camundongos

Como as anteriores, a TAB. VI apresenta os títulos e índices do sorteio 6 a 6 do tratamento B.

TABELA VI - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram 6 grupos por diluição de vírus.

Número de ordem	título/ml*	IPC*
1	1.28	4.54
2	1.28	4.54
3	1.28	4.54
4	1.39	4.43
5	1.44	4.38
6	1.46	4.36
7	1.50	4.32
8	1.51	4.31
9	1.54	4.28
10	1.59	4.23
11	1.59	4.23
12	1.61	4.21
13	1.62	4.20
14	1.64	4.18
15	1.67	4.15
16	1.71	4.11
17	1.72	4.10
18	1.73	4.09
19	1.78	4.04
20	1.85	3.97
21	1.86	3.96
22	1.87	3.95
23	1.88	3.94
24	1.91	3.91
25	2.08	3.74
26	2.17	3.65

*DL 50% em \log_{10}

*Índice de Proteção Camundongos

Os títulos e índices encontrados no sorteio 8 a 8 do tratamento B são mostrados na TAB. VII, da mesma maneira que nas anteriores.

TABELA VII - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram 8 grupos por diluição de vírus.

Número de ordem	título/ml*	IPC*
1	1.02	4.80
2	1.07	4.77
3	1.15	4.67
4	1.30	4.52
5	1.34	4.48
6	1.37	4.45
7	1.38	4.44
8	1.42	4.40
9	1.51	4.31
10	1.54	4.28
11	1.54	4.28
12	1.55	4.27
13	1.56	4.26
14	1.57	4.25
15	1.60	4.22
16	1.64	4.18
17	1.67	4.15
18	1.68	4.14
19	1.68	4.14
20	1.71	4.11
21	1.73	4.09
22	1.76	4.06
23	1.87	3.95
24	1.90	3.92
25	2.04	3.78
26	2.08	3.74

*DL 50% em \log_{10}

*Índice de Proteção Camundongos

A TAB. VIII indica os títulos e índices encontrados no sorteio 12 a 12 do tratamento B.

TABELA VIII - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos lactentes, filhos de mães submetidas ao tratamento B, quando se empregaram 12 grupos por diluição de vírus.

Número de ordem	título/ml*	IPC*
1	1.12	4.70
2	1.18	4.64
3	1.19	4.63
4	1.24	4.58
5	1.24	4.58
6	1.30	4.52
7	1.41	4.41
8	1.43	4.39
9	1.50	4.32
10	1.53	4.29
11	1.53	4.29
12	1.53	4.29
13	1.56	4.26
14	1.56	4.26
15	1.63	4.19
16	1.65	4.17
17	1.67	4.15
18	1.69	4.13
19	1.70	4.12
20	1.74	4.08
21	1.78	4.04
22	1.83	3.99
23	1.88	3.94
24	1.91	3.91
25	1.96	3.86
26	1.99	3.83

*DL 50% \log_{10}

*Índice de Proteção Camundongos

A TAB. IX resume os títulos e índices do sor-
teio 16 a 16 do tratamento B.

TABELA IX - Titulação do vírus "O" de Febre Aftosa em camun-
dongos lactentes, filhos de mães submetidas ao
tratamento B, quando se empregaram 16 grupos por
diluição de vírus.

Número de ordem	títulos/ml*	IPC*
1	1.24	4.58
2	1.28	4.54
3	1.30	4.52
4	1.30	4.52
5	1.34	4.46
6	1.38	4.42
7	1.39	4.41
8	1.45	4.37
9	1.54	4.28
10	1.60	4.22
11	1.61	4.21
12	1.68	4.14
13	1.73	4.09
14	1.73	4.09
15	1.74	4.08
16	1.79	4.03
17	1.81	4.01
18	1.84	3.98
19	1.87	3.95
20	1.88	3.94
21	1.88	3.94
22	1.89	3.93
23	1.96	3.86
24	1.96	3.86
25	2.11	3.71
26	2.15	3.67

*DL 50% em \log_{10}

*Índice de Proteção Camundongos

A elaboração da TAB. X, que é um resumo dos resultados das TAB. III a IX, permite que seja avaliados, por cálculos estatísticos, os valores dos dados obtidos, quando são usadas diversas quantidades de grupos por diluição de vírus, no tratamento B.

TABELA X - Indicadores obtidos a partir dos Índices de Proteção Camundongos, quando se usaram diversas quantidades de grupos por diluição de vírus, no tratamento B.

Indicadores	nº de grupos por diluição de vírus						
	1	2	4	6	8	12	16
Média dos índices	4,18	4,10	4,21	4,17	4,26	4,25	4,15
Desvio padrão	0,78	0,63	0,32	0,23	0,27	0,25	0,27
Erro padrão da média	0,15	0,12	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05
Coeficiente de variação	19%	15%	8%	6%	6%	6%	7%
Amplitude de variação	2,44	2,45	0,89	0,89	1,06	0,87	0,91

O cálculo da "significância entre duas médias" mostrou que os valores dos índices médios não são significativamente diferentes.

As variações nos valores dos índices podem ser avaliadas no GRAF. 1 onde se verifica que há mais dispersão nos experimentos onde se usou 1 e 2 grupos por diluição de vírus e menos nos demais. É apresentada também a faixa de variação de ± 12 desvios padrão de cada experimento, a partir média geral dos índices médios, que foi de 4,19.

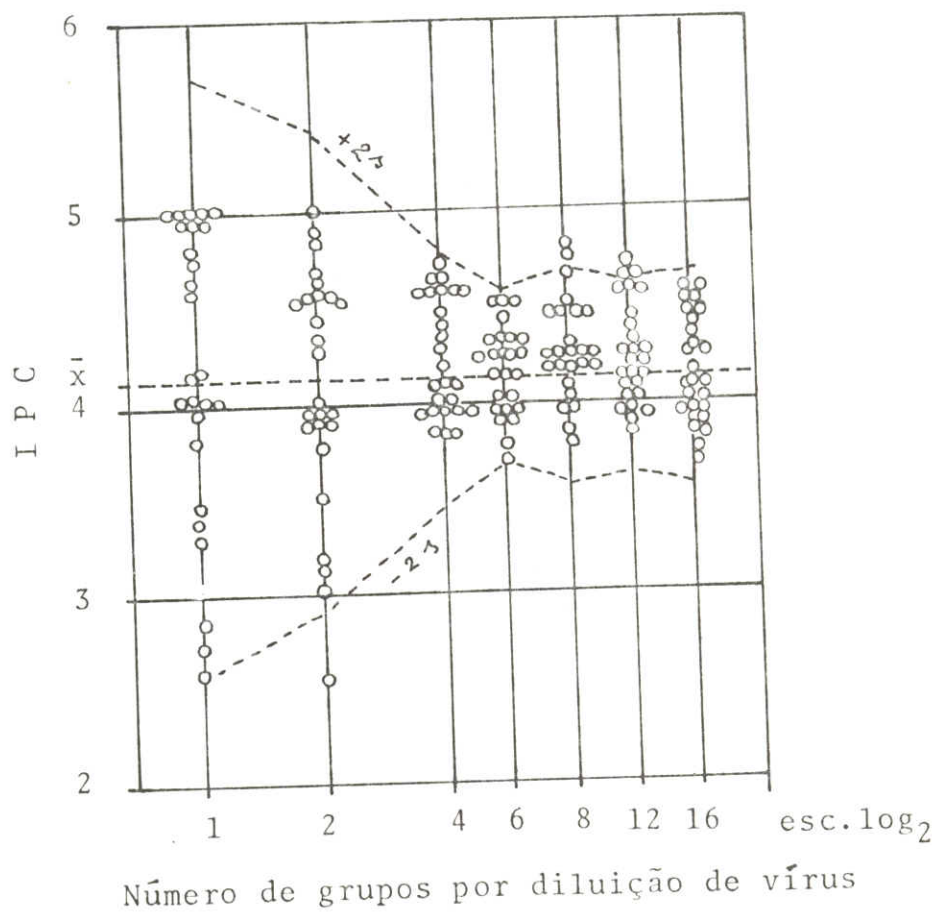


GRÁFICO 1 - Dispersão do Índice de Proteção Camundongos das 26 repetições de cada prova, com diversos números de grupos por diluição de vírus no tratamento B, a média dos índices médios e a variação de ± 2 desvios padrão.

A significância da diferença entre os desvios padrão foi obtida pelo cálculo de "z" e os resultados são apresentados na TAB. XI.

TABELA XI - Significância da diferença entre os desvios padrão obtidos, quando foram usadas diversas quantidades de grupos por diluição de vírus, no tratamento B.

Valores de "z" calculados:

		Número de grupos por diluição de vírus						
		1	2	4	6	8	12	16
Nº de grupos por diluição de vírus	1		0,211	*0,904	*1,251	*1,082	*1,159	*1,082
	2	0,211		*0,693	*1,040	*0,871	*0,949	*0,871
	4	*0,904	*0,693		*0,347	0,179	0,253	0,179
	6	*1,251	*1,040	*0,347		0,098	0,106	0,098
	8	*1,082	*0,871	0,179	0,098		0,253	0,115
	12	*1,159	*0,949	0,253	0,106	0,253		0,107
	16	*1,082	*0,871	0,179	0,098	0,115	0,107	

P: 0,05 - 0,333
 "z" tab. n_1 e n_2 : 25

*Diferença significativa

3.2. Segunda fase

Nessa fase foi usado um grupo por diluição de vírus e cada tratamento repetido 6 vezes.

Nos tratamentos C, D, E, F e G, as fêmeas foram vacinadas com vacina sem diluir, diluída 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 respectivamente. No tratamento H, foram inoculadas com diluente (testemunhas).

O título encontrado no tratamento H foi de $10^{5,89}$ DL 50% por ml.

A TAB. XII contém os Índices de Proteção Camundongos obtidos nas 6 repetições dos tratamentos C, D, F e G, a média, que corresponde ao uso de 6 grupos por diluição de vírus e outros indicadores estatísticos.

TABELA XII - Resultados das 6 repetições da prova de Índice de Proteção Camundongos, usando-se vírus "O" de Febre Aftosa em camundongos submetidos aos tratamentos C, D, E, F e G, e alguns indicadores estatísticos.

Repetições nº	Tratamentos				
	C	D	E	F	G
1	4,19	3,01	2,26	1,98	1,32
2	3,93	2,84	1,86	1,69	0,88
3	3,68	2,44	1,53	1,43	0,70
4	4,09	3,09	2,46	2,25	1,41
5	4,16	3,31	2,46	2,23	1,46
6	3,98	3,28	2,18	2,06	1,04
Média	4,00	3,00	2,13	1,94	1,14
Desvio padrão	0,19	0,32	0,37	0,32	0,31
Coeficiente de variação	5%	11%	17%	16%	27%
Erro padrão da média	0,08	0,13	0,15	0,13	0,13
Amplitude de variação	0,51	0,87	0,93	0,82	0,76

As diferenças entre as médias de cada tratamento, pelo cálculo da "significância entre duas médias", são significativas e o "coeficiente de correlação r" apresentou um valor de -0,98, indicando elevada correlação entre a diluição da vacina e o valor do Índice de Proteção camundongos. A "fidedignidade de r", pelo teste "t", determinou que o coeficiente de correlação é fidedigno (" $t_{\text{calc.}}$ " = 8,076 e " $t_{\text{tab.}}$ " = 3,182 para $P = 0,05$).

O GRAF. 2 apresenta os valores dos Índices de Proteção Camundongos em cada tratamento, a reta de regressão e a faixa de variação de ± 2 desvios padrão, a partir das médias corrigidas.

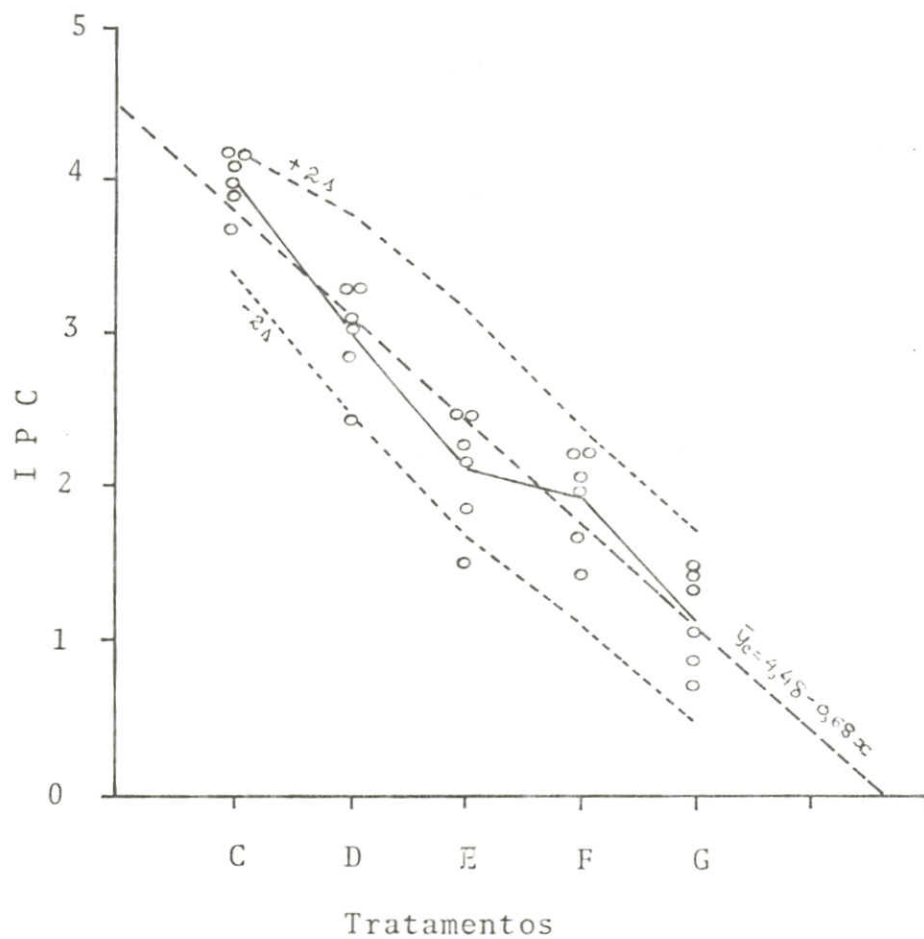


GRÁFICO 2 - Dispersão dos Índices de Proteção Camundongos em cada tratamento, os pontos médios, a reta de regressão (\bar{y}_c) e ± 2 desvios padrão a partir de \bar{y}_c .

4. DISCUSSÃO

Dos resultados obtidos, ressaltam alguns aspectos cuja discussão se impõe:

4.1. Transmissão de anticorpos contra Febre Afetosa da mãe aos filhotes de camundongos:

BULLOW (1962a) determinou que os anticorpos neutralizantes, formados na camundonga adulta, eram transmitidos aos filhotes pela placenta e pela amamentação.

Pelos resultados das titulações do vírus em camundongos lactentes, obtidos nos filhos de mães não vacinadas ($10^{5,82}$ DL 50%/ml) e nos filhos de mães vacinadas ($10^{1,64}$ DL 50%/ml), verifica-se, por análise estatística, que os valores diferem significativamente (Tabela I - Tratamento A e Tabela II - Tratamento B). Isso significa que realmente os camundongos filhos de mães vacinadas são bem mais protegidos contra o vírus que os filhos de mães não vacinadas, confirmando assim que há transferência de anticorpos da mãe aos filhotes.

4.2. Índice de Proteção Camundongos (IPC) como meio de tornar o método quantitativo:

O índice, que é o quociente do título dos testemunhos sobre o título dos vacinados (T/V), é um método consagrado já utilizado em diversos testes de eficiência em Febre Aftosa (CUNHA et alii, 1957; LUCAM & FÉDIDA, 1958; LUCAM et alii, 1962; LUCAM et alii, 1964; LUCAM et alii, 1964a; FONTAINE et alii, 1966 e SOLYOM & DEAK, 1975).

Pelos resultados obtidos nos diversos experimentos, verifica-se que o Índice de Proteção Camundongos (IPC) prestou-se a todos os cálculos estatísticos utilizados.

4.3. Variação dos resultados

A TAB. X, que é um resumo das TABS. III a IX, indica que os IPC_s médios, quando foram usados 1, 2, 4, 6, 8, 12 ou 16 grupos por diluição de vírus, não são significativamente diferentes, ou seja, as diferenças entre os IPC_s médios foram decorrência do acaso, sendo portanto as amostras pertencentes à mesma população.

Entretanto, a variabilidade não se comportou da mesma maneira. Os dados das TABS. III a IX mostram que existe uma variação nos resultados dos títulos e consequentemente dos Índices de Proteção Camundongos. No GRAF. 1, nota-se a dispersão dos IPC_s , que é mais acentuada nos experimentos em que se usou 1 e 2 grupos por diluição de vírus e menos nos demais. Pela TAB. X pode-se verificar que a amplitude de variação, o erro padrão da média e o desvio padrão têm valores mais altos nos experimentos em que se usou 1 e 2 grupos por diluição de vírus. O coeficiente de variação de Pearson apresentou valores de 19, 15, 8, 6, 6,6 e 7% respectivamente, quando se usou 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 16 grupos por diluição de vírus e conforme PIMENTEL GOMES (1956), os dois primeiros são considerados "médios" e os demais, "pequenos". Verificando, pelo cálculo de "z", a análise da significância da diferença entre os desvios padrão" (TAB. XI),

fica comprovado que não há diferença significativa entre os valores dos desvios padrão, quando se usou 1 ou 2 grupos, mas apresentam diferença significativa, quando se usaram 4, 6, 8, 12 e 16 grupos. Da mesma maneira, não houve diferença significativa entre si para os valores de 8, 12 e 16 grupos.

Embora os resultados obtidos, quando se empregaram 4 ou 6 grupos por diluição, não apresentem diferenças significativas de quando se usaram 8, 12 ou 16 grupos, o uso de 4 e 6 grupos apresentou diferença significativa entre eles, mostrando que a variação quando se usaram 4 não é a mesma que quando se usaram 6 grupos.

Assim, pelos resultados da análise, o uso de 6 ou mais grupos por diluição apresenta variações pequenas e essas variações não são diferentes significativamente até 16 grupos por diluição, que foi o maior número de grupos utilizado neste trabalho.

4.4. Valores dos IPC_s com vacinas em diversas diluições:

A TAB. XII mostra que as provas de eficiência de vacinas antiaftosa em diversas diluições, usando-se 6 grupos por diluição de vírus, confirmaram os estudos anteriores, já que o tratamento C, quando foi usada vacina sem diluir, não teve o valor da média dos IPC_s , diferente da do tratamento B, pelo "teste de significância entre duas médias".

Os resultados dos IPC_s das médias dos tratamentos em que foram usadas vacinas sem diluir, diluída 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16, entretanto, apresentaram diferenças significativas entre elas, indicando que são amostras de populações distintas.

O "coeficiente de correlação r" e a "fidedignidade de r" pelo teste "t" mostraram que existe correlação en

tre a diluição da vacina e o valor dos IPC_5 . O GRAF. 2 visualiza essa correlação. Esses dados confirmam a assertiva de BULOW (1962), apesar desse autor ter usado no seu trabalho apenas três diluições da vacina e não ter apresentado uma análise estatística do evento.

5. CONCLUSÕES

É possível o uso do teste de eficiência de vacinas anti-aftosa utilizando camundongos recém-nascidos, filhos de mães vacinadas, já que:

5.1. O uso de um índice, o Índice de Proteção Camundongos (IPC), dá ao teste uma conotação numérica, tornando-o assim quantitativo e permitindo sua comparabilidade.

5.2. A variação dos resultados pode ser reduzida a um nível aceitável, quando são usados na titulação do vírus, pelo menos 6 grupos de camundongos por diluição. Dessa maneira é conseguida a repetibilidade do teste.

5.3. A correlação existente entre os valores dos IPC_s e o uso de vacinas em diversas diluições, caracterizou o poder de discriminação do teste.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECHMANN, G. Versuche zur Wirksamkeitsprüfung von Maul- und-Klauenseuche-Vaccinen an Mäusen. Zbl.Vet.Med. Berlin Reihe B 17:286-299, 1970.
2. BODON, L. Typing foot-and-mouth disease virus with the agar gel diffusion method. Acta.Vet.Acad.Sci.Hung. Budapest. 5:157-159, 1955.
3. BULOW, V. Wirksamkeitsprüfung von Formoladsorbatvaccine an der Maus mit Hilfe der Säuglingsimmunität. Zbl.Vet.Med., Berlin. 9:499-506, 1962.
4. BULOW, V. Immunitätsübertragung von Muttermäusen aus ihre Jungen bei der Maul-und Klauenseuche. Zbl.Vet.Med., Berlin. 9:543-554, 1962 a.
5. CROXTON, F. E. & COWDEN, D.J. Estatística Geral e Aplicada, IBGE, Rio de Janeiro, 1952. 1096p.
6. CUNHA, R.G. Demonstration of immune response of Foot-and-mouth disease vaccine in protection test in young adult mice. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., N. York. 103:700-703, 1960.
7. CUNHA, R.G., BAPTISTA JR., J.A., SERRÃO, U.M., TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactentes en la evaluation de los anticuerpos contra el virus de la Fiebre Aftosa

- e su significacion immunologica. Gac.Vet., B. Aires , 19:243-267, 1957.
8. DAVIES, E.B., MARTIN, W.B., PETO, S. A test in chicks for the potency of inactivated Foot-and-mouth Disease vaccines. Res.Vet.Sci., Londres, 4:413-422, 1963.
 9. FONTAINE, J., DUBOUCLARD, C., BORNAREL, P. Vaccination anti-aphteuse du moton. Recherche d'une méthode de controle de l'immunité. Bull.Off.Int.Epiz., Paris , 65:195-212, 1966.
 10. HENDERSON, W.M. & GALLOWAY, I.A. The use of culture virus in the preparation of foot-and-mouth disease vaccine. J.Hyg.Camb., Cambridge, 51:546-558, 1953.
 11. LUCAM, F., DHENNIN, L., DHENNIN, L., FÉDIDA, M. Essais de vaccination anti-aphteuse intradermic chez le porc. Resultats obtenus au laboratoire. Bull.Off.Int.Epiz. Paris; 57:924-934, 1962.
 12. LUCAM, F. & FÉDIDA, M. Une nouvelle méthode quantitative pour l'appréciation de l'immunité anti-aphteuse. Bull.Off.Int.Epiz., Paris, 49:596-621, 1958.
 13. LUCAM, F., Fédida, M., DANNACHER, G. Mesure de l'immunité anti-aphteuse du boeuf, par épreuve sur le cobaye. Rev.Med.Vet., Paris, 115:225-245, 1964.
 14. LUCAM, F., FÉDIDA, M., DANNACHER, G. Mesure de l'immunité anti-aphteuse post-vaccinale du boeuf au moyen d'une épreuve de séro-neutralisation en culture de tissus. Bull.Acad.Vet. France, Paris, 37:175-180, 1964 a.
 15. MANNINGER, R. & MOCSY, J. Hutyra-Marek-Manninger-Mocsy-Patologia y terapeutica especiales de los animales domesticos. Labor, Barcelona. 1º vol. 1968. p.476.
 16. PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental. Nobel, S. Paul, 1976. p.16.

17. REED, L. & MUENCH, H. A simple method of estimation fifty percent endpoint. Am.J. Hyg., Baltimore. 27:493-497, 1938.
18. ROSENBUSCH, C.T. & CARDARELLI, A.C. Utilization del cobayo en la medicion antigeno inmunitaria de vacunas antiaftosas. Congreso Argentino de Fiebre Aftosa . B. Aires, 14-16 Mai 1957.
19. SKINNER, H.H. Propagation of strains of Foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. Proc.Royal Soc. Med., Londres. 44:1041-1044, 1951.
20. SKINNER, H.H. One week old white mice as test animals in Foot-and-mouth disease research. Proc.XV Int. Vet. Congress Stockolm Part I Vol.I: 195-199, 1953.
21. SOLYOM, F. & DEAK, F. Efficiency testing of Foot-and-mouth disease vaccines in adult mice by the E-index method. Bull.Off.Int.Epiz., Paris. 83:443-465, 1975.
22. TRAUB, E. & BECHMANN, G. Indirekte Komplementbindung mit Mäuseseren nach Schutzimpfung mit monovalenter Maul-und Klauenseuche-Vaccine. Zbl.Vet.Med., Berlim Reihe B 16:240-252, 1969.
23. TRAUB, E., THEIN, P., KESTING, F. A simple potency test for Foot-and-mouth disease vaccines in mice and comparison of results with those of potency tests in cattle. Zbl.Vet.Med., Berlim, Reihe B 17:389-400, 1970.
24. TRAUB, E., THEIN, P., KESTING, F. Antibody response in mice inoculated whith monovalent or trivalent Foot-and-mouth disease vaccines. Zbl.Vet.Med., Berlim, Reihe B 17:497-507, 1970a.
25. UHLMANN, W. & TRAUB, E. Versuche zur Prüfung von Maul-und-Klauenseuche-Vakzinen an erwachsenen Mäusen. Mh. Tierh., Berlim, 10:105-112, 1959.