

## TEST DE NEUTRALIZACION EN VIRUS DE POLIOMIELITIS EN LA POBLACION DE SANTIAGO (CEPA LANSING)

Por los Dres. Prof. BENJAMIN VIEL V. y FEDERICO CATTANEO C.

Instituto Bacteriológico de Chile. Sección Virus: Dr. Raúl Palacios,  
Cátedra Extraordinaria de Higiene y Medicina Preventiva: Prof. Dr. Benjamín Viel V.

### Fundamentos.

No constituye para nadie un secreto que la poliomielitis encierra uno de los más apasionantes problemas de la Medicina actual, ya sea que se le enfoque desde el punto de vista clínico, o del epidemiológico y sanitario.

Autores hay quienes han creído hallar mención de esta enfermedad en el Antiguo Testamento y en los escritores hipocráticos; otros autores, tal vez más optimistas, sostienen haber encontrado sus huellas aún en las momias del Egipto, cosa que, por lo demás, ha acontecido con casi todas las enfermedades de respeto que han acosado a la humanidad.

Sin embargo, los primeros destellos de esta nueva estrella de la patología en el cielo del conocimiento científico, sólo se vienen a apreciar con las descripciones clínicas de Underwood y Medin en 1784 y 1799, respectivamente. Desde entonces, los brotes de poliomielitis se han hecho más y más frecuentes, hasta alcanzar cifras catastróficas, en especial luego de la guerra mundial Nº 1, tales como las incidencias de 4,7 y 2,3 por mil habitantes, registradas en las epidemias de Nueva York e Islandia en 1924 y 1916, respectivamente (cit. por Romero)<sup>1 2</sup>.

La enfermedad tiene, sin lugar a duda, grandes hechos llamativos y a veces discordantes con los fenómenos que caracterizan a la mayoría de las enfermedades infecciosas. Entre ellos pode-

mos anotar: tendencia a abarcar cada vez mayores masas humanas, preferencia marcada para lactantes y preescolares que vivan aisladamente, su distribución estacional que no coincide ni con las infecciones de transmisión por vía aérea, ni con las de transmisión entérica, su prevalencia en países de condiciones sanitarias avanzadas, su predilección para ciertas razas, su letalidad directamente proporcional a la edad, etc.

Pero de todas estas peculiaridades de la poliomielitis hay una que merece ser citada aparte, por ser tal vez la que más personalidad epidemiológica le otorga a la enfermedad de Heine-Medin, nos referimos a su tendencia a presentarse en olas epidémicas, pasadas las cuales la enfermedad se reduce prácticamente a cero hasta el momento en que, años después, reaparece un nuevo brote. Frente a tal situación surge espontáneo el siguiente doble interrogante: primero, qué se ha hecho el virus causante en este período interepidémico, y segundo, por qué termina el brote epidémico. El primer interrogante ha quedado resuelto al haberse logrado aislar el virus causal en la faringe y deposiciones de individuos aparentemente sanos y que podrían actuar de reservorios; asimismo, por haber sido detectado el virus en igual período en el agua de la alcantarilla<sup>18 19 21 25 32 33 34 35</sup>.

Si la causa no desaparece, ya que estos portadores siguen siendo fuente de contagio, la única explicación a nuestro

segundo interrogante estaría en el agotamiento de los susceptibles.

Si la epidemia desaparece por agotamiento de los susceptibles, resulta extraño que tal agotamiento se produzca después de haber ocurrido tan pocos casos clínicos diagnosticables durante el brote. Reconocemos un fenómeno similar en el sarampión, en el cual el brote epidémico desaparece después de que todos o casi todos los susceptibles han enfermado, lo que representa miles de casos.

En la poliomielitis, en cambio, el descenso de la curva epidémica se produce después de un ínfima proporción de casos clínicos. La lógica nos indica que no habría otra manera de comprender el fenómeno sino admitiendo una enorme cantidad de casos sub-clínicos, por entero inaparentes, que habrían inducido inmunidad, provocando así un fenómeno parecido al ocurrido en el sarampión.

La clínica actual apoya fuertemente esta concepción al reconocer la existencia de cuatro formas de enfermedad: paralítica, cuyo diagnóstico da lugar a escasas dudas; no paralítica, pero con compromiso del sistema nervioso, reconocible por cierta rigidez de la nuca y alteraciones inflamatorias del líquido céfalo raquídeo, y no paralítica, sin compromiso del sistema nervioso, en todo similar a un resfrío común. Como fácilmente se comprenderá, estas dos formas suelen ser diagnosticadas en períodos epidémicos. Por último, poliomielitis inaparente, totalmente indetectable clínicamente.

Epidemiólogos y clínicos estarían entonces de acuerdo que en una epidemia de poliomielitis enfermarían todos los susceptibles, haciéndolo únicamente muy pocos en la forma paralítica, sola forma conocida antaño. La confirmación de las ideas expuestas tiene su demostración indiscutible en el Test de Neutralización<sup>8 10 13 14 15 16 18 19 20 21 24 28 30</sup>. Consiste en inocular a animales de experimentación susceptibles, mezclas de material virulento con el elemento cuya capacidad para neutralizar el virus se investiga (suero, emulsión de tejido, etc.) y observar la producción o no de sintoma-

tología típica en el animal. Sabemos que algunas especies de monos enferman de poliomielitis cuando se les inocula por diversas vías material infectante. Como la infección se produce prácticamente en el 100% de los casos así tratados, si mezclamos el material infectante con el suero sanguíneo de un individuo, lo inoculamos al mono y no se produce parálisis, debemos admitir en el suero la presencia de un cuerpo neutralizante que inactivó al virus inoculado. En esta forma se habla de test de neutralización positivo (+) cuando el animal inoculado con la mezcla no enferma, y negativo (—) cuando aparece la parálisis con caracteres parecidos a los observados al inyectar material infectante en forma pura.

Un test de esta naturaleza no podía difundirse debido al alto precio del mono. Por eso, al aparecer la cepa de virus Lansing adaptada a la laucha blanca<sup>8</sup>, se contó con un animal susceptible de mucho menor precio que permite la realización del test descrito con mucho más facilidades que las que se tenían en la época en que el mono era el único animal reconocido como susceptible. Además, dado el bajo costo, los tests se pudieron realizar empleando un mayor número de animales, eliminando así posibles interferencias por factores casuales.

En Chile, existe el consenso unánime que la enfermedad progresa abarcando cada vez más y prueba de esto es el cada vez mayor número de casos incluidos en cada brote. La inquietud desarrollada por tal fenómeno ha hecho impacto en el cuerpo médico, tal como prueba la existencia de tres tesis de prueba desarrolladas desde 1913 en adelante sobre este tema<sup>3 4 5</sup>, además de nutridas y frecuentes presentaciones realizadas, en igual lapso, a las diferentes sociedades médicas por los profesionales del país. Sin embargo, toda la anterior serie de trabajos versa únicamente sobre una de las múltiples facetas de la poliomielitis, su aspecto clínico. Debemos esperar hasta el trabajo de Romero y Armijo<sup>1</sup> y luego Romero y colaboradores<sup>2</sup>, para ver enfocado desde un segundo y un tercer ángulo a

la poliomielitis, nos referimos a sus aspectos epidemiológico y sanitario.

Si la enfermedad en su forma epidémica es nueva en Chile, como se puede suponer, la mayoría de los componentes de nuestra población debería arrojar un alto porcentaje de susceptibles y, por esta razón, a fines de 1949 decidimos investigar por primera vez en el país, a través del test de neutralización en cepa Lansing adaptada a la laúcha blanca, la presencia de anticuerpo específico en la población normal de Santiago a diferentes edades. Si nuestros hallazgos nos mostraran una proporción de tests positivos comparable a la encontrada, en edades similares, en ciudades europeas o americanas, en las cuales el fenómeno hubiere sido investigado, nuestra conclusión y, por lo tanto, la confirmación de lo que perseguíamos, sería que en el suero de la población normal de Santiago existe anticuerpo específico contra la cepa Lansing, que, de acuerdo con las anteriores explicaciones, sería evidencia de una alta proporción de enfermedad subclínica que hubiera causado tal fenómeno; enfermedad inaparente, que sería, a su vez, testigo de la existencia de ondas epidémicas registradas o no por la estadística oficial.

Nuestro propósito primitivo se vió enriquecido al aparecer un brote epidémico de poliomielitis en diciembre de 1949, lo cual nos permitió practicar el test de neutralización en enfermos y convalecientes. Esta última parte de nuestra experiencia será comentada después de exponer los resultados obtenidos en los grupos de sanos.

#### Técnica.

Nuestro trabajo se llevó a cabo en 3 series de 50 individuos de ambos sexos: una de menores de 5 años, otra de edad entre 5 y 15 años y una tercera de 16 y más años.

Los individuos cuya sangre se usó en nuestros experimentos fueron escogidos al azar y sin ninguna selección entre los controles sanos de instituciones tales como Unidad Sanitaria, Bancos de San-

gre, Servicio Médico Nacional de Empleados, Servicios de Ortopedia, etc., de modo que los sujetos integrantes en el experimento pudiesen ser considerados como muestras de la población normal.

**Extracción de sangre.** — La sangre se extrajo por punción venosa en cantidad de aproximadamente 5 cc, recibida en tubos esterilizados al autoclave, se trasladó inmediatamente al Instituto Bacteriológico, en donde se procedió a la obtención de los sueros mediante la siguiente técnica: centrifugado a 2'000 r. p. m. durante 15'; los sueros así extraídos se conservaron a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de su uso.

**Animales empleados.** — Se usaron constantemente laúchas blancas de la cepa Swiss del Dr. Webster, proporcionadas por el criadero del Instituto.

**Virus empleado.** — En todos nuestros experimentos se empleó el virus Lansing adaptado a la laúcha blanca. Se encuentra en el cepario del Instituto Bacteriológico de Chile desde 1943, fecha en que fué traído a Chile por el Dr. R. Palacios, habiéndolo él obtenido del Laboratorio del Dr. Webster, U. S. A., en su 47<sup>o</sup> pasaje en laúcha. Aquí se efectúan pasajes mensuales en laúcha, conservándosele entre pasaje y pasaje en glicerina al 50 % en agua destilada y a  $0^{\circ}$  C.

**Preparación del inóculo.** — Previa a cada inoculación de nuestro experimento se realizó el proceso siguiente: se molió con carborundum en polvo médulas de laúchas provenientes del cepario. Durante la molienda, para facilitarla y obtener la dilución deseada, se agregó la cantidad necesaria hasta obtener una suspensión de médula al 10 % en suero fisiológico, a 100 cc, del cual se había previamente agregado 5 cc de suero normal de cobayo. La emulsión era luego centrifugada a 1'000 r. p. m. durante 5' y del sobrenadante se inoculó 0,3 ml por vía intracerebral a cada una de 20 laúchas, previa anestesia etérea. Tal dosis corresponde a más o menos 360 d. m. 50<sup>o</sup>. A medida que en estos animales se presentó parálisis, se les sacrificó y

con sus médulas se realizó el mismo proceso, hasta lograr una emulsión de 10 % en suero fisiológico. Este fué, a la postre, el material virulento que se uso como inóculo fresco en todos nuestros tests.

**Mezcla suero-virus.** — El suero humano se diluyó al 10 % en suero fisiológico y se agregó a iguales cantidades de emulsión de virus fresco al 10 % también. La mezcla se incubó a baño de maría a 37° C durante 60', se enfrió luego para evitar que los últimos sueros a ser inoculados permanecieran a la temperatura ambiente más tiempo que los primeros. De esta mezcla se inoculó 0,3 ml a cada láucha por vía intracerebral, previa anestesia etérea. La dilución final fué 1/20, o bien, 5 %, lo que aproximadamente corresponde a 280 d. m. 50. El número de láuchas empleado fué de 8 para cada suero; como control, en cada grupo de tests se inoculó 8 láuchas con igual técnica y condiciones, pero en cuyas mezclas el suero humano era reemplazado por igual cantidad de solución salina más suero de cobayo al 5 %. Fué ésta una prueba constante de la virulencia del material empleado.

**Interpretación de resultados.** — Cada grupo de tests fué observado a diario durante 30 días, lo que hizo que nuestro trabajo tuviera una duración de cerca de 2 años en total. En el cómputo final no se tomó en cuenta las muertes de animales fallecidos el día siguiente a la inoculación, consideradas como traumáticas; asimismo se consideró inespecíficas las muertes posteriores a tal plazo,

pero no precedidas de parálisis. Igual criterio se observó frente a láuchas fallecidas que hubiesen presentado diarrea.

De acuerdo con la mayoría de los autores<sup>10</sup>, se consideró neutralizante total (++) aquel suero de cuyas 8 láuchas inoculadas, 2 o menos hubiesen fallecido presentando parálisis previa; parcialmente neutralizante o protectorio (+) aquel con 3 ó 4 láuchas fallecidas en iguales condiciones. Negativo, no neutralizante o no protectorio (—) aquel de cuyas 8 láuchas fallecieron con sintomatología entre 5 y el total. En cierta ocasión en que se tuvo gran mortalidad inespecífica por infección bacteriana de los inóculos comprobada al cultivo, se repitió el experimento. Las muertes precedidas de diarrea, lo mismo que las posteriores al segundo día de la inoculación, fueron escasas y sólo excepcionalmente alcanzaron a dos animales, de modo que por tal causa no hubo que repetir experimentos.

### Resultados.

Como es de fácil apreciación en el cuadro N° 1, se ve que el poder neutralizante de los sueros y por ende, la presencia de anticuerpo específico en la sangre aumenta progresivamente y en proporción con la edad del individuo y así mientras en los menores de 5 años tenemos<sup>9</sup> un 52 % de sueros negativos, entre 5 y 15 años este tenor alcanza sólo a 2 % y entre los adultos a 6 %. De la misma manera, mientras los escolares y adultos arrojan<sup>7</sup> 88 % y 84 % de sueros neutra-

Cuadro N° 1.

Resultados del test de neutralización practicado en 150 personas no seleccionadas y aparentemente sanas de Santiago entre IX-1949 y II-1951, según edad;

Edad	N° casos tot.	%	tests (+)	%	tests (++)	%	tests (—)	%	tot. % pos.
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
—5	50	100	1	2	23	46	26	52	48
5/15	50	100	5	10	44	88	1	2	98
16+	50	100	5	10	42	84	3	6	94

lizantes totales, entre los preescolares tal fenómeno se verifica únicamente en un 46 %. Igual cosa valga para los sueros incluidos bajo el rubro de neutralizantes parciales<sup>4</sup>.

A pesar de la evidencia del fenómeno pasaremos, sin embargo, a investigar la significancia estadística del fenómeno, evitando así toda influencia de azar. Para hacer esto agruparemos los sueros parcial y totalmente neutralizante en un solo grupo.

Cuadro N° 2

"Test" de significancia estadística de los resultados del cuadro N° 1.

Edad	% tests positivos (+) y (+)	Desviación standard x/6
-5	48	7,1
5/15	98	1,9
16+	94	3,4

Desviación standard diferencial entre -5 años y 5/15 años  $x/6$  diff. = 6,8;  $P < 0.0000015$ .

Desviación standard diferencial entre 5/15 años y 16 + años  $x/6$  diff. = 1,02;  $P = 0.3077$ .

El valor de  $P < 0.0000015$  indica claramente que por azar un resultado tal como el obtenido sólo se habría logrado menos de una vez en un millón de veces

Comparando el total de los tests positivos de los individuos entre 5 y 15 años con el total de los positivos de los sujetos de mayor edad, vemos que el porcentaje favorece a los primeros. Esto estaría en franca pugna con lo universalmente comprobado<sup>20 22 31 44 45</sup> y que pretendemos con nuestro trabajo corroborar. Considerando, sin embargo, lo reducida que es la diferencia, pensamos que tal resultado pueda ser efecto del azar y para rechazar o confirmar nuestra sospecha, procedemos a aplicar también en este caso las disciplinas estadísticas, tal como se observa en el cuadro N° 2. Efectivamente, la desviación standard diferencial  $x/6 = 1,02$  encontrada tiene un valor P correspondiente a 0,3077, lo que, a su vez, nos dice que de repetir 100 veces el experimento, en 30,77 de ellas obtendremos resultados similares a los logrados por la sola influencia del azar, lo que hace que ambos resultados sean prácticamente iguales.

El cuadro que sigue a continuación, N° 3, nos demuestra cuán parecidos a los nuestros son los resultados obtenidos en el extranjero en esta clase de investigaciones.

Se encontraba ya en desarrollo nuestro trabajo cuando estalló en Santiago la epidemia de poliomielitis de 1949/50. Considerando la oportunidad que se nos

Cuadro N° 3

Resultados del test de neutralización en el suero de 303 niños de color en Baltimore City en 1945<sup>20</sup>.

Edad	N° casos (-)	N° casos (+)	N° casos (++)	% tot. pos.
-4 años	222	125	60	45
5/9"	38	8	10	79
10/14"	43	6	11	86

que se repitiera el experimento. Hay luego algo que hace que el anticuerpo específico aumente conforme progresa la edad del individuo, y esto, en ausencia de enfermedad, no puede sino ser el contacto del virus con el organismo en algunas de las formas de enfermedad inaparente.

presentaba, quisimos detectar el anticuerpo específico en los afectados, para lo cual recolectamos 50 muestras de sueros de enfermos menores de 5 años de edad. No hicimos diferenciación entre enfermos agudos y crónicos por diversas razones, entre ellas porque la mayoría de los autores, con la sola excepción de

Cuadro N° 4.

Resultados del test de neutralización realizado en Santiago en 50 enfermos de poliomieltis menores de 5 años entre enero y marzo de 1950 comparado con el de niños sanos de igual edad.

Edad	tot. casos	%	tests (+)	%	tests (++)	%	tests (—)	%	tot. pos. %
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Enf.	50	100	9	18	20	40	21	42	58
San.	50	100	1	2	23	46	26	52	48

Hammon<sup>18</sup>, ha encontrado que el anticuerpo específico no varía sensiblemente en uno y otro grupo y, además, por las dificultades que significaba localizar al enfermo ya fuera del medio hospitalario y la extracción de sangre en estas circunstancias. Los resultados que obtuvimos así como su comparación con los obtenidos en los menores de 5 años sanos pueden apreciarse en el cuadro N° 4.

Desviación standard diferencial  $x/6$  diff. = 1;  $P = 0,3173$ .

Al observar en el cuadro los porcentajes totales podríamos pensar que los enfermos presentan un mayor poder neutralizante frente al virus Lansing. Sin embargo, el estudio estadístico y el valor de  $P$ , desvirtúan esto, diciéndonos claramente que tales resultados, los de sanos y enfermos son prácticamente iguales. ¿Cómo explicar esto? Creemos que dos son las respuestas a darse, o bien, el alza del anticuerpo específico es tardía, hipótesis contra la cual se yerguen numerosos trabajos experimentales<sup>9 16 38 39</sup>, o bien, la última epidemia de poliomieltis no estuvo relacionada con la cepa Lansing y los casos positivos hallados se deberían a contactos anteriores de los pacientes con el virus. Esta segunda hipótesis la hallamos más satisfactoria, ya que experimentalmente se ha tipificado varias cepas de virus de poliomieltis<sup>16 17 26 27 28 40 43</sup>. En el día de hoy se encuentran ya aisladas 25 cepas diferentes de virus, antigénicamente agrupables en 3<sup>29</sup>, una de las cuales es la Lansing. Por eso si no existe el test de neutralización positivo del convaleciente, es posible pensar que la enfermedad fué producida por otra cepa, no re-

lacionada antigénicamente con la que nosotros usamos.

### Conclusiones.

1. Se comprueba la existencia de anticuerpo específico Lansing en la población normal de Santiago.

2. La presencia de anticuerpo específico en la población de Santiago aumenta proporcionalmente con la edad, alcanzando su máximo entre 5 y 15 años; los porcentajes encontrados concuerdan, en líneas generales, con los de la mayoría de los autores.

3. El test de neutralización en cepa Lansing adaptada a la laúcha blanca no tiene valor diagnóstico en caso de duda.

4. En la última epidemia de poliomieltis habida en Santiago la cepa de virus Lansing adaptada a la laúcha blanca parece no haber tenido gran participación.

### Summary.

The existence of specific Lansing antibody was demonstrated in the normal population of Santiago.

The presence of the specific antibody in Santiago's population, increases proportionally to age reaching its maximum between 5 and 15 years; the percentages found are in agreement with those given by the majority of the authors.

The neutralization test in Lansing strain adapted to the white mouse has no diagnostic value in doubtful cases.

In the recent poliomyelitis epidemic in Santiago the Lansing virus strain adapted to the white mouse, does not seem to have had a great participation.

## Bibliografía.

## Chilena:

- 1.—ROMERO, H. y ARMLJO. — Rev. Chil. Hig. Med. Prev. XIX: 399, 1948.
- 2.—ROMERO, H.; TAPIA, L. y VILDOSOLA, J. — Rev. Chil. Hig. Med. Prev. XXII: 23, 1951.
- 3.—HERRERA, H. — "Contribución al estudio de la par. inf.". Tesis Fac. Med. y Farm. Imp. El Progreso. 1917.
- 4.—MORAGA, G. — "Par. Inf. Est. Act. de su est. y contribución al tratamiento quirúrgico". Tesis Fac. Med. y Farm. Imp. y Lit. Universo. Santiago. 1931.
- 5.—PRIETO, E. — "Poliomielitis Ant. Ag. de la infancia y su tratamiento actual". Tesis Fac. Med. Univ. de Chile. Imp. La Gratitud Nacional. Santiago. 1928.
- 6.—PIZZI, M. — "Los métodos estadísticos y su aplicación a la Medicina". Imp. Universitaria. 1947. Santiago.

Nota.—Existe, además de la citada, una copiosa cantidad de trabajos nacionales sobre poliomiélitis, que no creemos del caso citar, por ser eminentemente de índole clínica y no relacionada con el carácter experimental de nuestro trabajo.

## Extranjera:

- 7.—ARMSTRONG, CH. — Pub. Health. Rep. 54: 1719, 1939.
- 8.—ARMSTRONG, CH. — Pub. Health. Rep. 54: 2302, 1939.
- 9.—TURNER, T. and YOUNG, L. E. — Am. Jour. Hyg. 37: 67, 1943.
- 10.—YOUNG, L. E. and MERRELL, M. — Am. Jour. Hyg. 37: 80, 1943.
- 11.—MORGAN, I. M. — Am. Jour. Hyg. 45: 373, 1947.
- 12.—JUNGBLUT, C. W. and DALLDORF, G. — Am. Jour. Hyg. 43: 49, 1946.
- 13.—HAMMON, W. Mc. D. and IZUMI, E. M. — Proc. Soc. Biol. and Med. 49: 242, 1942.
- 14.—TOOMEY, J. A. and TAKACS, W. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 47: 123, 1941.
- 15.—HARFORD, C. G. and BRONFENBRENNER, J. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 47: 211, 1941.
- 16.—KESSEL, J. F.; STIMPERT, F. D. and FISK, R. T. — Am. Jour. Hyg. 26: 46, 1939.
- 17.—STIMPERT, F. D. and KESSEL, J. F. — Am. Jour. Hyg. 35: 285, 1939.
- 18.—MC. CLURE, G. Y. and LANGMUIR, A. D. — Am. Jour. Hyg. 35: 285, 1942.
- 19.—HOWE, H. A. and BODIAN, D. — Am. Jour. Hyg. 40: 224, 1944.
- 20.—TURNER, TH.; AUS, M. C.; YOUNG, L. E. and STARBRUCK, M. E. — Am. Jour. Hyg. 42: 119, 1945.
- 21.—ZINKEL, A. R. — Am. Jour. Hyg. 46: 248, 1947.
- 22.—PAIT, CH.; KESSEL, J. F. and GROSSMAN, PH. — Am. Jour. Hyg. 47: 335, 1948.
- 23.—BELL, J. E. — Am. Jour. Hyg. 47: 351, 1948.
- 24.—BOLE, J. E. — Am. Jour. Hyg. 48: 361, 1948.
- 25.—BROWN, C.; AINSLIE, J. D. and FRANCIS, TH. Jr. — Am. Jour. Hyg. 49: 194, 1949.
- 26.—BODIAN, D. — Am. Jour. Hyg. 49: 200, 1949.
- 27.—MORGAN, I. M. — Am. Jour. Hyg. 49: 225, 1949.
- 28.—BODIAN, D.; MORGAN, I. M. and HOWE, H. A. — Am. Jour. Hyg. 49: 234, 1949.
- 29.—KESSEL, J. F. and PAIT, CH. F. — Am. Jour. Hyg. 51: 76, 1950.
- 30.—BODIAN, D.; MORGAN, I. M. and SCHWERDT, C. E. — Am. Jour. Hyg. 51: 128, 1950.
- 31.—TURNER, TH.; HOLLANDER, D. H.; BUCKLEY, S.; KOKKO, P. U. and WINDSOR, CH. P. — Am. Jour. Hyg. 52: 323, 1950.
- 32.—PEARSON, H. E. and RENDTORFF, R. — Am. Jour. Hyg. 41: 164, 1945.
- 33.—PEARSON, H. E. and RENDTORFF, R. — Am. Jour. Hyg. 41: 179, 1945.
- 34.—PEARSON, H. E.; BROWN, G. C.; RENDTORFF, R. C.; RIDENON, G. M. and FRANCIS, TH. — Am. Jour. Hyg. 41: 186, 1945.
- 35.—HOWE, H. A. and BODIAN, D. — Am. Jour. Hyg. 45: 219, 1947.
- 36.—MELNICK, J. L. — Am. Jour. Hyg. 45: 240, 1947.
- 37.—SMITH, TH. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 53: 86 (1943).
- 38.—BROWN, G. C. and FRANCIS, TH. — Jour. Imm. 57: 1, 1947.
- 39.—HAMMON, W. D.; MACK, W. N. and REEVES, C. — Jour. Imm. 57: 287, 1947.
- 40.—JUNGBLUTH, W. — Am. Jour. Pub. Health 34: 259, 1944.
- 41.—SILVERMAN, C. A. — Am. Jour. Pub. Health 31: 593, 1941.
- 42.—LANGMUIR, A. — Am. Jour. Pub. Health 32: 275, 1942.
- 43.—AYCOCK, L. W. — Am. Jour. Med. Science 204: 455, 1942.
- 44.—HAAS, V. H. and ARMSTRONG, CH. — Pub. Health Rep. 55: 1061, 1941.
- 45.—RIORDAN, P. J. A. — Am. Jour. Hyg. 52: 323, 1950.
- 46.—PETERS and VAN VOORHIS. — "Statistical Procedures and their Mathematical bases". Mc Graw-Hill Book Company Inc. New-York and London 1940.