

INVESTIGACION DE ANTICUERPOS INHIBIDORES
DE LA HEMAGLUTINACION PARA RUBEOLA
EN MUJERES EN EDAD FERTIL

Asdrúbal Valles Inciarte*, Hugo Machado Paz** e Iris Sánchez*

RESUMEN

Se hace una revisión breve sobre aspectos clínicos de la rubéola y de algunos hechos importantes relativos a dicha enfermedad y su agente causal. Dado que la importancia primordial de esta enfermedad viral estriba en sus efectos teratogénicos, se realizó una encuesta serológica mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación en un grupo de mujeres en edad fértil. Se estudiaron 202 alumnas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, 190 de ellas (94%) comprendidas en el grupo etario de 20 a 24 años. Se observó un índice de positividad de 50%, que es muy bajo comparado con estudios similares. Se recomienda un estudio seroepidemiológico más completo a objeto de conocer a cabalidad la situación real del problema de la rubéola en nuestro medio.

INTRODUCCION

La rubéola es una enfermedad transmisible común de la infancia, caracterizada por síntomas constitucionales leves. La erupción es similar a la del sarampión o a la de la fiebre escarlatina en sus formas leves o a una combinación de ambas y se acompaña de un marcado agrandamiento y sensibilidad de los ganglios linfáticos post-occipitales, retro-auriculares y cervicales posteriores. En general la rubéola puede ser considerada como la menos peligrosa de todas las enfermedades transmisibles agudas de la

* Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

** Cátedra de Virología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

infancia. Bajo circunstancias ordinarias hay pocas complicaciones, y los signos y síntomas caen tan rápidamente como ellos aparecen(2*). Sin embargo, en adultos, especialmente mujeres, la rubéola puede ocasionar artralgia, artritis y ocasionalmente encefalitis(22); en los niños puede dar lugar a la aparición de púrpura trombocitopénica(1*). La gran importancia médica de la rubéola reside cuando afecta a la mujer durante el primer trimestre del embarazo, por las malformaciones congénitas que produce en el feto. Estos defectos fueron descritos por primera vez en 1941 por Gregg(14), oftalmólogo australiano, quien hizo la observación acerca de la presencia de catarata congénita usualmente bilateral, defectos cardíacos, microftalmia, bajo peso al nacer, en niños nacidos de madres que habían padecido la rubéola durante el primer trimestre de su embarazo. Subsecuentemente tanto éstas como otras anomalías congénitas, tales como sordera, retardo mental, microcefalia, han sido observadas y descritas por otros investigadores en diversos países del mundo (e. 20, 21, 26, 27, 29, 30, 32, 44, 47).

Los experimentos de transmisión de la enfermedad en voluntarios humanos realizados por Krugman y colaboradores(9) sugirieron el carácter infeccioso y viral de la enfermedad. Desafortunadamente la imposibilidad de poder cultivar el virus impidió durante mucho tiempo el diagnóstico virológico y la prevención de esta enfermedad, hasta que en 1961 Weller y Neval(28) en la Escuela de Salud Pública de Harvard, y Parkman y colaboradores(22) en el Instituto de Investigación Walter Reed, trabajando independientemente unos de otros y usando técnicas diferentes, lograron cultivar el virus de la rubéola a partir de sangre y orina los primeros, y de lavados de garganta los segundos; dichas muestras fueron obtenidas de pacientes con diagnóstico clínico de rubéola. También Parkman y colaboradores(22,24,26) se han encargado de estudiar las características y propiedades del virus.

En 1962, Sever(28) hace las modificaciones al sistema de microtécnica concebido en 1950 en Hungría por el Dr. Gyula Takatsky. A partir de entonces este sistema ha sido de considerable ayuda en los trabajos de serología viral.

A pesar del aislamiento del virus y del avance en los sistemas de microtécnica, durante varios años y desde el punto de vista serológico, sólo se dispuso de la prueba de neutralización como arma diagnóstica, que aunque segura y útil es muy costosa, complicada y consume mucho tiempo; por otra parte los bajos títulos de anticuerpos neutralizantes para rubéola dificultan la interpretación de los resultados. Similares problemas presenta el método de anticuerpos fluorescentes. En 1967 Stewart y colaboradores(41) reportan una hemaglutinación específica del virus de

rubéola y el desarrollo de una prueba de inhibición de la hemaglutinación. Según expresan Lennette y Schmidt(28) "la prueba de inhibición de la hemaglutinación para rubéola es hoy el procedimiento serológico más ampliamente usado para el diagnóstico de infección y determinación del estado de inmunidad. Es un método altamente sensible para la detección de anticuerpos y la prueba serológica más práctica desde el punto de vista económico y de la rapidez con la cual pueden ser obtenidos sus resultados".

El conocimiento epidemiológico de la rubéola en cuanto a su prevalencia se dificulta enormemente por varios motivos, entre los cuales es dable mencionar la deficiente notificación de los casos clínicamente diagnosticados; por otra parte la enfermedad suele manifestarse en forma subclínica, en muchas ocasiones es confundida con sarampión y en general la benignidad del padecimiento hace que los pacientes no soliciten atención médica. El desarrollo de vacunas a virus vivo(1, 10, 11, 12, 15, 17, 20, 25, 42, 45, 46) ha permitido establecer un control adecuado de la enfermedad en mujeres en edad de concebir. Sin embargo, para la planificación de campañas de vacunación hay que determinar los patrones de inmunidad adquirida por infección natural aparente o inaparente, el grado de protección logrado en la población femenina en cuestión, y establecer la verdadera necesidad de mantener un nivel de protección mínimo que impida la aparición de brotes. En un intento inicial de conocer el estado inmunitario en nuestro medio, hemos realizado un estudio en un sector de la población femenina de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

MATERIAL Y METODOS

Previamente fue solicitada la colaboración voluntaria de las estudiantes, haciendo énfasis acerca de la importancia del estudio a realizar. Se llenó una pequeña ficha de cada una de las donantes, en la cual se anotaron datos personales y datos clínicos de rubéola, incluyendo contacto con enfermos.

Se utilizaron para la experiencia 202 voluntarias, estudiantes de la Facultad de Medicina cuyas edades oscilaron entre 19 y 25 años. Las muestras de sangre se obtuvieron por venipuntura, colectándolas en tubos estériles al vacío (Vacutainer, B-D, Rutherford, New Jersey, USA), se dejaron coagular a 4°C, se separaron los sueros mediante centrifugación en frío a 2.000 rpm por 10 minutos, y se almacenaron en frascos viales estériles a temperatura de -20°C hasta ser probados. Los inhibidores no

específicos fueron removidos mediante tratamiento con Heparina-Cl₂Mn (14,37). Estos inhibidores de la actividad hemaglutinante del virus de la rubéola han sido identificados bioquímicamente como beta-lipoproteínas(7); de allí la efectividad del tratamiento con Heparina-Cl₂Mn.

Prueba de inhibición de la Hemaglutinación.

Las pruebas se realizaron utilizando el sistema de microtitulación y en general se siguieron las normas sugeridas por el Center for Disease Control(s), excepto que se utilizaron placas con hoyos en "U" y que las pruebas se realizaron a temperatura ambiente (22° a 24°C). Los sueros fueron probados en diluciones seriadas al doble desde dilución 1:8 hasta 1:512, considerando positivos los que inhibían la hemaglutinación a partir de la dilución 1:8. Se incluyeron en cada prueba dos sueros testigos positivo y negativo. Fue utilizado antígeno de dos fuentes comerciales (Behringwerke AG, Marburgo, Alemania y Gibco, Grand Island, New York, USA), preparado en células BHK-21, ambos extraídos con Tween-éter. Se utilizaron dos unidades hemaglutinantes del antígeno. Se emplearon glóbulos rojos de pollo de un día de edad, en concentración al 50% en buffer Hapes-Salina-Albúmina bovina-Gelatina (HSAG) para la absorción de las aglutininas heterófilas presentes en los sueros y al 0,25% para la titulación del antígeno y realización de la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

RESULTADOS

La Tabla I presenta el número total de personas que participaron en el estudio, divididos en tres grupos etarios y sus correspondientes porcentajes. Como puede observarse, el mayor porcentaje corresponde al grupo etario de 20 a 24 años con 190 personas (94,0%), luego el grupo de 15 a 19 años con 11 personas (5,5%) y el de 25 a 29 con una persona (0,5%). Es menester hacer la observación de que en la actualidad no se disponen de datos fidedignos acerca de la población estudiantil, y es obvio que tampoco de los alumnos de la Facultad de Medicina. Sin embargo datos presuntivos nos permiten suponer que la muestra estudiada corresponde aproximadamente a un 10% de la población estudiantil femenina, así como también el de que un 75% de dicha población está comprendida en edades que van de 19 a 23 años.

En la Tabla II se resume el estado inmunológico de la población estudiada. De las 202 personas estudiadas 101 (50%) resultaron sero-positivas, es decir con un título de anticuerpos de 8 ó mayor. Un resultado similar se obtuvo para los susceptibles, constituido por 101 personas (50%), es decir con títulos de anticuerpos menor de 8.

TABLA I

DISTRIBUCION POR GRUPOS DE EDAD DE LA INVESTIGACION
SEROLOGICA DE INMUNIDAD A LA RUBEOLA

GRUPOS ETARIOS AÑOS	NUMERO DE PERSONAS	PORCENTAJE
15-19	11	5,5
20-24	190	94,0
25-29	1	0,5
TOTAL	202	100,0

TABLA II

ESTADO INMUNOLOGICO PARA LA RUBEOLA

Total de alumnas estudiadas	202	100%
Inmunes (Titulo ≥ 8)	101	50,0%
Susceptibles (Titulo $<$ de 8)	101	50,0%

La Tabla III expresa la distribución por grupos etarios, el número de inmunes y susceptibles y sus porcentajes. Al igual que en la Tabla I, el mayor número de inmunes y susceptibles están incluidos en el grupo de 20 a 24 años. La única persona estudiada perteneciente al grupo de 25 a 29 años resultó inmune.

La Tabla IV muestra la distribución de la frecuencia de títulos inhibidores de la hemaglutinación, observándose que hay 82 sueros con títulos de 64 o más, lo que corresponde a un 81,2% de la positividad.

De las 202 alumnas encuestadas 134 manifestaron haber presentado clínica de la enfermedad o tenido contacto con enfermos; de ellas resultaron 76 inmunes y 58 susceptibles. Sesenta y ocho alumnas manifestaron no haber tenido clínica ni contacto con enfermos; de ellas resultaron 25 inmunes y 43 susceptibles (Tabla V).

La figura 1 muestra la distribución de la frecuencia de los títulos en los sueros estudiados, observándose que hay 101 seronegativos (< de 8) y en los positivos, 82 sueros con títulos de 64 o más.

TABLA III
DISTRIBUCION POR GRUPOS ETARIOS DEL ESTADO
INMUNOLOGICO PARA LA RUBEOLA

GRUPOS ETARIOS (Años)	INMUNES	%	SUSCEPTIBLES	%
15-19	5	45,5	6	54,5
20-24	95	50,0	95	50,0
25-29	1	100,0	-	0,0

TABLA IV
TITULOS DE ANTICUERPOS INHIBIDORES DE LA
HEMAGLUTINACION

TITULO	NUMERO DE SUEROS	PORCENTAJE
8	0	0,0
16	3	3,0
32	16	15,8
64	24	23,8
128	26	25,7
256	21	20,8
512	11	10,9
TOTAL	101	100,0

TABLA V
DATOS CLINICOS DE RUBEOLA - RELACION CON INMUNIDAD

	N° DE PERSONAS	INMUNES	SUSCEPTIBLES
Antecedentes clínicos de Rubéola	70	54	16
Contacto	64	22	42
Ni clínica de Rubéola ni contacto	68	25	43
TOTAL	202	101	101

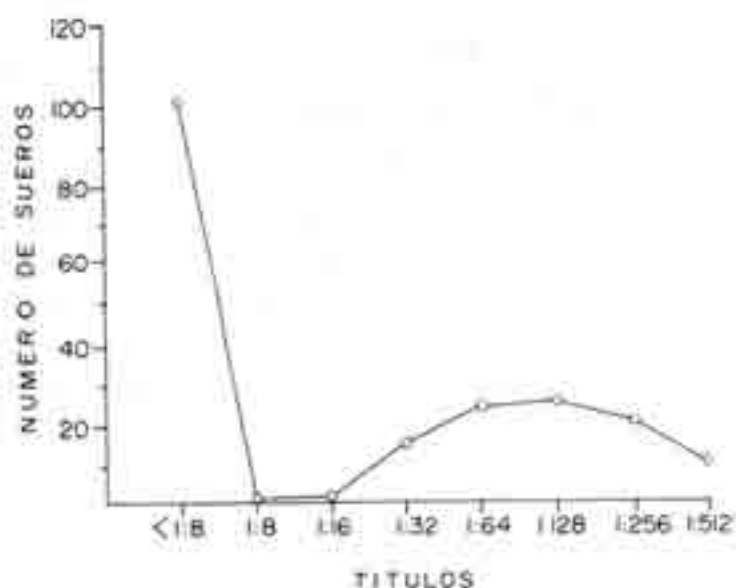


Fig.1.-Distribución de los Títulos Inhibidores de la Hemaglutinación en 202 Estudiantes Femeninas.

DISCUSION

Debido a que una significativa proporción de infecciones por el virus de la rubéola son subclínicas, las encuestas serológicas son útiles en trazar la epidemiología de la rubéola(49). El diagnóstico realizado solamente sobre bases clínicas está expuesto a error.

La mayoría de los estudios serológicos para rubéola han sido realizados mediante pruebas de neutralización y de inhibición de la hemaglutinación, existiendo una buena correlación entre ambos procedimientos.

En base a las dos pruebas antes mencionadas, en muchos países por lo menos el 80% de las mujeres en edad fértil tienen niveles detectables de anticuerpos(5); sin embargo, en Jamaica, Trinidad, Hawai, Japón y Tailandia, las proporciones son mucho menores variando de 34 a 67%. Estas diferencias no pueden ser explicadas sobre la base de una susceptibilidad étnica, ni se ha encontrado que dependan de diferencias rural-urbana o de la presencia o ausencia de movimientos de población, según Cockburn(5).

En la presente investigación donde se estudiaron 202 mujeres en edad fértil, sólo 101 (50%) resultaron con anticuerpos detectables.

Halstead y col(1*) en una encuesta realizada en alumnas de la Universidad de Hawai y nacidas en esta isla, encuentran apenas un 23% de sero-positivas (18 de 79); 49 de dichas estudiantes están comprendidas en el grupo de 20 a 24.

Por el contrario Evrard(1,2) en 1141 alumnas de la Universidad de Brown (Estados Unidos de Norteamérica), encuentra un 74% de positividad. Angeles y colaboradores(2) en 316 alumnas de la Universidad Iberoamericana de México obtienen un 89,9% de positividad (284 de 316).

En Estados Unidos de Norteamérica, laboratorios de Salud Pública(4) de 8 Estados, realizaron una encuesta desde julio de 1971 a marzo de 1973, entre la población femenina. Estudiaron 52.123 personas, obteniendo una seropositividad del 86%. El grupo de 10 a 14 años presentó un 68% de inmunes, pero a partir del grupo de 15 a 19 años el nivel de inmunidad va en aumento (81%) hasta alcanzar un 91% de positividad en el grupo de más de 40 años.

Un hecho resultante en los resultados obtenidos en nuestra encuesta es que, de los 101 seropositivos, 82 tienen títulos de 1:64 ó mayores, indicativos de una inmunidad bien establecida(2*).

Llama la atención el alto número de susceptibles en el grupo de voluntarias que dijeron haber sufrido la enfermedad o al menos haber tenido contacto con enfermos de rubéola. Se evidencia así lo expuesto por otros autores(5,24) sobre la dificultad de hacer un diagnóstico preciso sobre bases clínicas solamente. Por otra parte, del grupo que no tiene historia ni de enfermedad ni de contacto, el 36,8% (25 de 68) presenta inmunidad contra rubéola, lo que avala la observación de que, como sucede en otras enfermedades virales, en rubéola también las infecciones inaparentes o subclínicas tienen una alta incidencia(9,21,25).

La encuesta indica además, que en la población estudiada hay un desconocimiento amplio acerca de las implicaciones de esta enfermedad en el embarazo, por lo cual es recomendable la realización de una campaña educativa sobre este problema.

A pesar de que el estudio se ha realizado en una muestra relativamente pequeña, creemos que los resultados obtenidos pudieran tener la suficiente validez para indicarnos el estado inmunitario de la población de la ciudad, ya que las estudiantes encuestadas provienen de diversos estratos de la población general.

SUMMARY

Research into inhibitory antibodies of the haemagglutination for German Measles in women in fertile age

Vallejos Arte A (Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela), Machado Paz H, Sanchez L. Invest Clín 16(1): 129-132, 1975. A brief review on clinical aspects of rubella was done. Some important events in relation to disease and rubella virus are mentioned. Since the main importance of this viral illness is based on its teratogenic effects, a serological survey was performed in a group of women in child bearing age using hemagglutination-inhibition test. Two hundred and two (202) female medical students from the Zulia University were studied. One hundred and ninety of them (94%) between 20 and 24 years of age. Fifty percent responded positively, which is too low compared with similar studies performed in other countries. A more careful and thorough seroepidemiological study is recommended with the purpose to define completely the actual situation of the Rubella problem in our environment.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ABRUTYN E, HERRMANN KL, KARCHMER AW, FRIEDMAN JP, PAGE E, WITTE JJ: Rubella vaccine comparative study. Nine-month follow up and serologic response to natural challenge. *Amer J Dis Child* 120: 129-133, 1970.
- 2- ANGELES M, GUTIERREZ G, GARCILAZO J: Estudio inmunológico de la rubéola en un grupo de alumnas de la Universidad Iberoamericana, Ciudad de México. *BoI OSP* 71: 402-410, 1971.
- 3- CENTER FOR DISEASE CONTROL: A procedural guide to the performance of the standardized rubella hemagglutination-inhibition test. Atlanta, Georgia. The Center 47 • 9 p. 1970.
- 4- CENTER FOR DISEASE CONTROL: Rubella Surveillance. Atlanta, Georgia. The Center 18 p. 1973.
- 5- CENTER FOR DISEASE CONTROL: Morbidity and Mortality Weekly Report 23: 341-348, 1974.
- 6- COCKBURN WCH: World aspects of the epidemiology of rubella. *Amer J Dis Child* 118: 112, 1969.
- 7- CHANG TW, WEINSTEIN L: Studies of nonspecific inhibition of the hemagglutinin of rubella virus and isolation and identification of the inhibitor. *Amer J Med Scien* 263(4): 233-239, 1972.

- 8- DESMOND MM, MONTGOMERY JR, MELNICK JL, COHRAN GG, VERNIAUD W: Congenital rubella encephalitis. Effects on growth and early development. *Amer J Dis Child* 118: 30-31, 1969.
- 9- DRUGMAN S, WARD R, JACOBS KG, LAZAR M: Studies on rubella immunization. I. Demonstration of rubella without rash. *JAMA* 151: 285-288, 1953.
- 10- DUDGEON JA: Vacunas antirubeólicas. *Boi OSP* 74: 411-424, 1973.
- 11- ENDERS JF: Rubella vaccination. *New Eng J Med* 283: 261-263, 1970.
- 12- EVRARD JR: Rubella immunity testing and immunization of college women. *Am J Obstet Gynecol* 116: 71-75, 1973.
- 13- FARQUHAR JD: Follow-up on rubella vaccinations and experience with subclinical reinfection. *J Pediatr* 81: 460-465, 1972.
- 14- FELDMAN HA: Removal by Heparin-MnCl₂ of nonspecific rubella hemagglutinin serum inhibitor. *Proc Soc Exp Biol Med* 127: 570-573, 1968.
- 15- FOGEL A, MOSHKOWITZ A, RANNON L, GERICHTER CHB: Comparative trials of RA 27/3 and Cendehill rubella vaccines in adult and adolescent females. *Am J Epidemiol* 93: 392-398, 1971.
- 16- GREGG NM: Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans Ophthal Soc Austr* 3: 35, 1941.
- 17- HALSTEAD SB, CHAR DFB, DIWAN AR: Evaluation of three rubella vaccines in adult women. *JAMA* 211: 991-995, 1970.
- 18- HALSTEAD SB, DIWAN AR, ODA AI: Susceptibility to rubella among adolescents and adults in Hawaii. *JAMA* 210: 1881-1883, 1969.
- 19- HEGGIE AD, ROBBINS FC: Natural rubella acquired after birth. Clinical features and complications. *Amer J Dis Child* 118: 12-17, 1969.
- 20- HILLEMAN MR, BUYNAK EB, WHITMAN JK, WEIBEL RW, STOKES JRJ: Live attenuated rubella virus vaccines. Experiences with duck embryo cell preparations. *Amer J Dis Child* 118: 166-171, 1969.

- 21- HORSTMANN DM, PAJOT TG, LIEBHABER H: Epidemiology of rubella. Subclinical infection and occurrence of reinfection. *Amer J Dis Child* 118: 133-136, 1969.
- 22- KALODNER AL: In: Rubella. First Annual Symposium of the Eastern Pennsylvania Branch American Society for Microbiology. CC Thomas, Springfield, Illinois, p 123-128, 1973.
- 23- KHALIFA AS, WAHAB KSE, IMAM IZE: Seroimmunity to Rubella among an Egyptian population. *J Infect Dis* 127: 567-570, 1973.
- 24- KRUGMAN S: Rubella: Clinical and Epidemiological aspects. *New Eng J Med* 276: 477-482, 1967.
- 25- KRUGMAN S: Present status of measles and rubella immunization in the United States. A medical progress report. *J Pediatr* 78: 1-16, 1971.
- 26- LENNETTE EH, SCHMIDT NJ: In Rubella: First Annual Symposium of the Eastern Pennsylvania Branch American Society for Microbiology. CC Thomas Springfield, Illinois, p 18-31, 1973.
- 27- MAGUREANU E, GROBNICU M, BOIEZ D: Contribution to the serologic diagnosis of rubella. Application of a modified hemagglutination and inhibition method. *Rev Roum Inframicrobiol* 8: 165-167, 1971.
- 28- NAJERA E, NAJERA R, PEREZ GALLARD P: The seroepidemiology of rubella. The independent analysis of current prevalence and past incidence in serological surveys in Spain. *Bull World Health Organization* 49: 25-30, 1973.
- 29- NELSON WE Y COL: *Textbook of Pediatrics*. 9th ed. Philadelphia Saunders, 1970.
- 30- OJALA P, VESIKARI T, ELO O: Rubella during pregnancy as a cause of congenital hearing loss. *Am J Epidemiol* 98: 395-401, 1973.
- 31- ORNOY A, SEGAL S, NISHIMI MA, POLISHUK WZ: Fetal and placental pathology in gestational rubella. *Am J Obstet Gynecol* 116: 949-956, 1971.
- 32- PARKMAN PD, BUESCHER EI, ARTENSTEIN MS: Recovery of Rubella virus from Army recruits. *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 225-230, 1962.

- 33- PARKMAN PD, BUESCHER EL, ARTENSTEIN MS, MC COWN JM, MUNDOW FK, DRUZD AD: Studies of Rubella. I. Properties of the virus. *J Immun* 93: 595-607, 1964.
- 34- PARKMAN PD, HOPPS HE, MEYER HM: Rubella virus: Isolation, characterization and laboratory diagnosis. *Amer J Dis Child* 118: 68-77, 1969.
- 35- PARKMAN PD, MEYER HM, KIRSCHTEIN RL, HOPPS HE: Attenuated rubella virus. 1. Development and laboratory characterization. *New Eng J Med* 275: 569-574, 1966.
- 36- PLOTKIN SA, COCHRAN W, LINDQUIST JM, COCHRAN GG, SCHAFFER DB, SCHEIE HG, FURUKAWA T: Congenital rubella syndrome in late infancy. *JAMA* 200: 435-441, 1967.
- 37- RAUSEU AR, RICHTER P, TALLAD L, COOPER LZ: Hematologic effects of intrauterine rubella. *JAMA* 199: 75-78, 1967.
- 38- SEVER JL: Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J Immun* 88: 320-329, 1962.
- 39- SIEGEL M, FUERST HT, DUGGAN W: Rubella in mother and congenital cataracts in child. *JAMA* 203: 116-120, 1968.
- 40- SIEGEL M, FUERST HT, GUINEE VF: Rubella epidemicity and embryopathy. *Amer J Dis Child* 12: 469-473, 1971.
- 41- STEWART GI, PARKMAN PD, HOPPS HE, DOUGLAS RD, HAMILTON JP, MEYER HM: Rubella-virus hemmagglutination-inhibition test. *New Eng J Med* 276: 554-557, 1967.
- 42- STOKES JrJ, WEIBEL RE, VILLAREJAS VM, ARGUEDAS JA, BUYNAC EB, HILLEMANN MR: Trivalent combined measles-mumps-rubella vaccine: Findings in clinical-laboratory studies. *JAMA* 218: 57-61, 1971.
- 43- STREISSGUTH AP, VANDERVEER BB, SHEPARD TH: Mental development children with congenital rubella syndrome. *Amer J Obstet Gynec* 108: 391-399, 1970.
- 44- SWAN C, TOSTEVIN AL, BLACK GHB: Final observations of congenital defects in infants following infectious diseases during pregnancy, with special reference to rubella. *Med J Austr* 2: 889-908, 1946.
- 45- WALLACE RB, ISACSON P: Comparative trial of HPV-77, DE-5 and RA 27/3 Liveattenuated rubella vaccines. *Amer J Dis Child* 124: 536-538, 1972.

- 46- WEIBEL RE, STOKES J, BUYNACK EB, WITHMAN JE, LEAGUS MB, HILLEMANN MR: Live attenuated rubella virus vaccines prepared in duck embryo cell culture. II. Clinical tests in families and in an institution. *JAMA* 205: 554-558, 1968.
 - 47- WEINBERGER MM, MASLAND MW, ASBED RA, SEVER JL: Congenital rubella presenting as retarded language development. *Amer J Dis Child* 120: 125-128, 1970.
 - 48- WELLER TH, NEVA FA: Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella-like illness. *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 215-225, 1962.
 - 49- WITTE JJ, KARCHMER AW, CASE G, HERRMANN KL, ABRUTYN E, KASSANOFF I, NEILL JS: Epidemiology of rubella. *Amer J Dis Child* 118: 107-111, 1969.
-