

DIAGNOSTICO PRENATAL DE CETONURIA DE
CADENA RAMIFICADA. MICROENSAYO APLICADO
A UN EMBARAZO DE ALTO RIESGO CON APARENTE DETECCION
DE UN FETO HETEROZIGOTO

H. Moreno Fuenmayor*

RESUMEN

Se cultivaron fibroblastos de la piel y células amnióticas en viales de los usados para conteo por centelleo líquido. Las células crecieron hasta la confluencia total y luego se determinó por método de dilución radioisotópica, la actividad de la decarboxilasa de cetoácidos de cadena ramificada sin resuspender las células de su monocapa de crecimiento. El método se puede practicar hasta con 2×10^5 células. Se determinó la actividad de la decarboxilasa de cetoácidos de cadena ramificada, en fibroblastos obtenidos de diversos tipos de pacientes referidos por problemas genéticos diferentes de la enfermedad en estudio. Así mismo se estudió la actividad enzimática en células amnióticas obtenidas, a las 16 semanas de gestación, de 7 controles normales y de la madre bajo estudio; y finalmente en los fibroblastos y leucocitos de la niña producto de este embarazo. Inicialmente se obtuvieron resultados que hacían pensar en que el feto en estudio sería heterocigoto, por lo cual se dejó evolucionar el embarazo hasta término. Sin embargo, la heterocigosidad no pudo comprobarse en el estudio postnatal.

INTRODUCCION

La cetonuria de cadena ramificada (CCR), conocida en la literatura anglosajona como enfermedad de orinas en jarabe de arce, es un error ingénito del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), el cual ha sido investigado en su mayor parte

* "Research Fellow" en el Departamento de Genética Humana, Escuela de Medicina, Universidad de Pennsylvania, Philadelphia, USA. Dirección actual: Unidad de Genética Médica, Hospital Universitario de Maracaibo, Apartado 1154, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

- 10 - SCHIMKE R N , KIRKPATRICK C H : Genetic studies in immunologic deficiency diseases *Immunologic Deficiency Diseases in Man* pag. 328-339. Birth Defects Original Article Series, Vol IV N° 1, February 1968, The National Foundation. Editors: Good, R.A , Finstad, J., Miescher, P.A. Smith, R.I.
- 11 - SERRANO H , RODRIGUEZ ITURBE B : Estudios inmunológicos como ayuda en la detección del rechazo en el homoinjerto renal. *Invest Clín* 10(29):9-27, 1969.
- 12 - SMIJEWSKI C M , FLETCHER J L , ST. PIERRE R L (Editors). *Immunoematology, Appendix 7: Antibody titrations*, pag. 277, Appleton-Century-Crofts, New York, 1968.
- 13 - STIEHM E R , FUDEMBERG H H : Serum levels in health and disease: a survey. *Pediatrics* 37:715-718, 1966.
- 14 - SOOTHILL J F : Immunoglobulins in first-degree relatives of patients with hipogammaglobulinemia. Transient hypogammaglobulinemia: a possible manifestation of heterozygoty. *Lancet* 1:1001-1002, 1968.
- 15 - TAYLOS B , NORMAN A P , ORGEL H A , TURNER M W , STOKES C R , SOOTHILL J F : Transient IgA deficiency and pathogenesis of infantile atopy. *Lancet* 2:111-112, 1973.
- 16 - WOLLHEIM F A , BELFRAGE S , COSTER C , LINDHOLM H : Primary "acquired" hypogammaglobulinemia. *Acta Med Scand* 176:1-16, 1964.

MATERIAL Y METODO

En el transcurso de la valoración prenatal con fines de diagnóstico de CCR en un feto, estudiamos la capacidad de los fibroblastos de la piel, para degradar Leucina-1-C¹⁴ en: a) controles; b) ambos padres (en la familia motivo de este estudio); c) en 2 líneas celulares provenientes de otros 2 heterocigotos obligatorios (gentilmente cedidas a nosotros por L.J. Elsas, Emory University, Atlanta, Ga.); d) en una línea homocigota mutante (CCR); también estudiamos las células amnióticas obtenidas después de la amniocentesis de la madre y de controles sanos, y los fibroblastos y leucocitos de la niña producto de la concepción de este embarazo. Los resultados obtenidos sugerían que el feto fuese heterocigoto y por lo tanto el embarazo se dejó evolucionar hasta término; sin embargo la ADCA en fibroblastos y leucocitos obtenidos de la niña producto del mismo, fue indistinguible de la de los controles.

Procedimientos de cultivo de las células: Por lo menos 10 líneas celulares control, obtenidas después de la biopsia cutánea por sacabocado, se colocaron en cultivos previa división de las mismas en explantes pequeños de aproximadamente 1 mm de diámetro. Estas líneas provenían de pacientes referidos a nosotros por diversidad de patología genética, distinta de la CCR. La mayoría de las líneas celulares se habían mantenido congeladas en nitrógeno líquido por varias semanas a meses. La criopreservación se hizo después de 2 ó 3 repiques en cultivos y, después de reconstituídas, se siguieron repicando en los mismos, pero nunca más allá del pase N° 30. La mayoría de los experimentos se realizaron con clones celulares entre los pases 5 y 20. Para la determinación de la ADCA en el feto se tomaron células amnióticas por amniocentesis a las 16 semanas de gestación, en la madre bajo estudio y en 7 controles con historia negativa para enfermedades hereditarias. La madre en estudio había tenido previamente un niño que murió a los 7 días de edad con evidencias clínicas y bioquímicas de CCR pero en el cual no se hicieron determinaciones in vitro de la ADCA. Dada la corta vida de las células amnióticas en cultivos, no se usaron más allá del pase N° 5.

El procedimiento de cultivo usado fue similar en ambos tipos de células como se describe a continuación para las células amnióticas, pero la concentración de suero fetal de ternera para fibroblastos fue sólo del 15%.

Las células amnióticas se obtuvieron después de centrifugar (400 x g x 8 minutos a 4°C) 10 a 12 ml de líquido amniótico obtenido por amniocentesis como se ha indicado. El botón celular obtenido se suspendió en dos tipos de medio: Eagle Minimal Essential Media (Flow Laboratories) y McCoy's 5a Modifiel (Grand Island Biological Co.), los cuales se

suplementaron con un 30% de suero fetal de ternera. Se agregaron antibióticos: penicilina/estreptomina (60 U/ml) en el medio de McCoy y Aureomicina (50 ug/ml) en el de Eagle.

En términos generales los cultivos se iniciaron con la cantidad de células suspendidas en unos 12 ml de medio el cual se repartía en 2 ó 3 frascos Falcon T30 plásticos (Falcon Plastics). Una vez obtenido adecuado crecimiento celular el cual se alcanzó en 2 ó 3 semanas, los cultivos se subcultivaron (usando medio de Puck con tripsina y EDTA(2), en viales desechables de vidrio de los usados para contaje por centelleo líquido (Kimble products No. 60975-L). Un Falcon T30 con células confluentes era suficiente para sembrar 4 ó 5 viales. Después de 3 a 5 días más de crecimiento se efectuaron los estudios enzimáticos. La cantidad de proteína celular obtenida después de los ensayos fue de aproximadamente 200 μ gs(s). 100 ug equivalen aproximadamente a 3×10^5 células. En ocasiones se hicieron ensayos con 65 μ gs de proteína.

Medida de la actividad enzimática: Las células adheridas al fondo de los viales se incubaron en 0.5 ml de amortiguador Krebs Ringer fosfato a pH 7.5 (ajustado con 5% de CO₂ en aire) el cual contenía 0.9 mM y 0.5 uCi/ml de leucina-1-C¹⁴ (New England Nuclear). Se preparó una solución 50X de leucina diluyendo en aminoácido marcado con 1-leucina no marcada (Nutritional Biochemical Corp.) y esta preparación se incubó en un agitador-incubador Dubnoff durante media hora a 37° colocándose un papel de filtro empapado de Soluene (Packard) en la boca de la botella. Luego se pasó una corriente de nitrógeno húmedo burbujeando en la mezcla durante 2 minutos. Este procedimiento, modificado de Dancis(4), eliminaba la radiactividad inespecífica que producía blancos con valores altos. En fibroblastos se hicieron además determinaciones de ADCA a las concentraciones de sustrato de 0.02 y 1.8 mM.

El medio de cultivo se eliminó inmediatamente antes de incubar y la capa de células se lavó 2 veces con 0.9% de NaCl. Las células se incubaron entonces a la temperatura ambiente durante 15 minutos en amortiguador sin aminoácidos. Al cabo de este tiempo se desechó este buffer y se comenzó la reacción mediante la adición de 0.5 ml de amortiguador fosfato con la leucina marcada. Los viales se colocaron en el Dubnoff durante 3 horas a 37°. Los blancos con células se trataron a tiempo cero con 0.5 ml de ácido tricloroacético (ATCA) al 10%. Los viales se cubrieron con tapas de goma inyectables. Un vial mas pequeño (vial central, Kontes N° K882330) se suspendió dentro del vial de incubación mediante un alambre de cobre N° 22 el cual se pasó a través de la tapa. La reacción se detuvo mediante la inyección a través de la tapa de goma de 0.5 ml de ATCA en el medio de incubación. El C¹⁴O₂ producido durante la

incubación se atrapó durante media hora a 4°C en 0.5 ml de Soluene inyectado en el vial central. Se determinó que estas condiciones bastaban para atrapar la totalidad de la radiactividad desprendida en forma de CO₂. La radiactividad atrapada se midió en 15 ml de líquido para contaje por centelleo líquido el cual contenía 5.88 gm de PPO y 0.12 gm de POPOP (Packard Permablend) por litro de tolueno. La radiactividad del medio de incubación (en alícuotas de 100 µl) se determinó en el mismo líquido de contaje por centelleo pero suplementado con Tritón X-100 (Packard) 30% v/v. El consumo de sustrato probó ser insignificante ya que no hubo esencialmente diferencias entre la radiactividad obtenida del blanco y de los viales incubados.

Determinación de la proteína celular: Después del paso anterior, el medio de incubación se eliminó y la capa de células todavía intacta se lavó por 5 veces con 0.9% de NaCl, a fin de eliminar la radiactividad adherida y se dejó secar. Luego se agregaron 0.5 ml de NaOH 1 N el cual disolvió durante la noche la monocapa celular. Este tratamiento se realizó a temperatura ambiente. Se determinó la cantidad de proteína presente mediante el método de Lowry y colaboradores(s) en alícuotas de 5 µl obtenidas por duplicado de esta solución. Se utilizó albúmina de suero bovino como standard.

Las determinaciones de radiactividad se hicieron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard N° 3320 con una eficiencia de conteo (contra standards obtenidos de New England Nuclear) de 79-80%.

RESULTADOS

Los resultados del estudio del metabolismo degradativo de la leucina-1-C¹⁴ por parte de los fibroblastos, aparecen en la Fig. 2 y en la Fig. 3. Están expresados en nmoles de C¹⁴O₂ atrapados después de 3 horas de incubación, por miligramo de proteína tisular precipitada con ATCA y son el resultado de por lo menos 2 experimentos distintos, por duplicado. En la mayoría de los casos se hicieron experimentos por triplicado y hasta cuadruplicado.

Se observó buena correlación intra e interexperimental para experimentos que se referían a la misma línea celular pero hubo gran variación de los resultados cuando se usaron diferentes líneas celulares control. A la concentración de 0.02 mM de leucina no se observaron diferencias entre controles y mutantes. La significación se observó a 0.9 mM ($p < 0.05$) y a 1.8 mM ($p < 0.001$). La ADCA fue también significativamente diferente ($p < 0.05$) entre las líneas celulares paterna y materna, a cualquier concentración de sustrato.

	controles	madre +/o	padre +/o
mM substrato	1.8 mM	1.8 mM	1.8 mM
nmoles C ¹⁴ O ₂	3.8 ± 1.4 (3) ₁	8.2 ± 1.8 (4) ₁	2.5 ± 0.9 (4) ₁
mM substrato	0.9 mM	0.9 mM	0.9 mM
nmoles C ¹⁴ O ₂	6.4 ± 2.4 (4) ₁	3.53 ± 0.44 (4) ₁	2.35 ± 0.22 (4) ₁
mM substrato	0.02 mM	0.02 mM	0.02 mM
nmoles C ¹⁴ O ₂	4.01 ± 3.4 (11) ₇	3.36 ± 0.23 (10) ₁	1.88 ± 0.17 (9) ₁
	proposito	controles heterocigotos	control homocigoto
mM substrato	0.9 mM	1.8 mM	0.9 mM
nmoles C ¹⁴ O ₂	5.01 ± 1.2 (2) ₁	8.9 ± 2.1 (2) ₂	0.0 (6) ₁

Fig. 2.— Nanomoles de C¹⁴O₂ producidos por mg de proteína, en fibroblastos normales y mutantes (1 homocigoto y 4 heterocigotos obligatorios) Los resultados de los ensayos practicados en células conservadas en su superficie de crecimiento (± 1 DS) se obtuvieron después de 3 horas de incubación, usando 3 diferentes concentraciones de substrato (mM). En paréntesis el número de experimentos; el subíndice representa el número de líneas celulares estudiadas +/o Heterocigotos obligatorios bajo estudio.

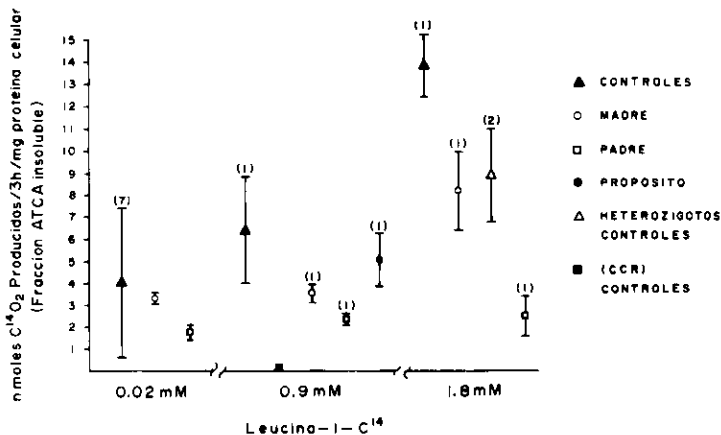


Fig. 3.— Nanomoles de C¹⁴O₂ producidos por mg de proteína en fibroblastos normales y mutantes usando 3 diferentes concentraciones de substrato. El signo corresponde a la media ± 1 DS. En paréntesis el número de líneas celulares estudiadas en cada caso.

Los resultados de los ensayos realizados en las células amnióticas, obtenidas de los embarazos controles y de la paciente, son como siguen: Controles: 10.53 ± 2.29 nmoles; paciente: 4.87 ± 1.06 nmoles. Todas las determinaciones en las células amnióticas se hicieron a una concentración de sustrato de 0.9 mM (Fig. 3). Las diferencias entre los 2 grupos son altamente significativas al nivel de $p < 0.005$.

La ADCA en los leucocitos de la niña producto de la concepción del embarazo en estudio se expresó en cpm por mg de proteína precipitada con ATCA después de 90 minutos de incubación de los leucocitos aislados y lavados 2 veces con amortiguador fosfato, pH 7.4. El resto del procedimiento fue similar al practicado en los cultivos. La actividad enzimática se midió tanto en sangre del cordón como en sangre periférica y se utilizó como control otro recién nacido de la misma edad. Los resultados promedio de 2 determinaciones en cada caso fueron como sigue: En la sangre de cordón: Control: 458 cpm (Rango: 433-483); paciente: 633 (Rango: 588-788). En la sangre periférica: Control: 425 cpm (Rango: 381-469); paciente 454 cpm (Rango: 388-521). La ADCA en los fibroblastos cultivados obtenidos por biopsia cutánea en la niña recién nacida resultó ser de 5.1 ± 1.2 nmoles

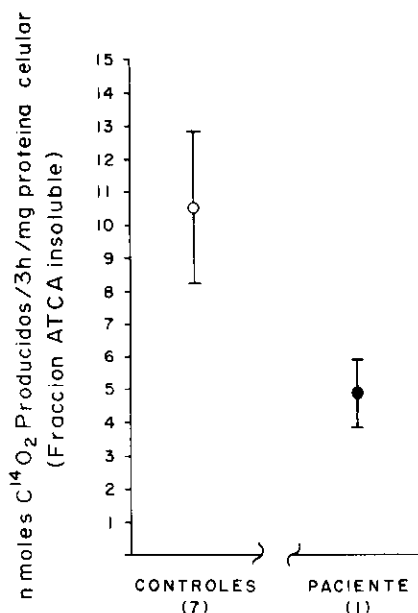


Fig. 4.— Nanomoles de $C^{14}O_2 \pm 1$ DS producidos por mg de proteína en 3 horas, por células amnióticas obtenidas de 7 controles sanos y de la madre en estudio, por amniocentesis a las 15-16 semanas de gestación.

DISCUSION

La decarboxilación oxidativa de los aminoácidos de cadena ramificada suplementados a la célula, requiere una compleja cadena de reacciones metabólicas las cuales se pueden medir in vitro solamente si la membrana celular está intacta. En extractos celulares y homogeneizados de las mismas es necesario usar como precursores de la reacción los alfa cetoácidos correspondientes, de difícil obtención y preparación en laboratorios no suficientemente provistos. Además, se ha reportado que los cetoácidos marcados presentan contaminantes volátiles que originan blancos con valores altos(3). Sin embargo, Wendel y colaboradores(14) han descrito recientemente un micro-método que utiliza alfa-cetoácidos como precursores metabólicos para medir la ADCA en fibroblastos intactos en monocapa. Otros autores han utilizado fibroblastos o células amnióticas en suspensión para las determinaciones de esta actividad enzimática con resultados satisfactorios; pero dicha metodología además de requerir un mayor número inicial de células, obliga a la utilización de enzimas proteolíticas (tripsina) o raspado con dedo de goma (o ambos) con el consecuente traumatismo celular.

Nosotros especulamos sobre el hecho de que tal traumatismo podría originar alteraciones del transporte de aminoácidos de cadena ramificada a través de la membrana celular y/o incrementar el número de células no viables y en consecuencia dificultar la diferenciación entre líneas celulares provenientes de heterocigotos y normales. Esta presunción se basó además en nuestra observación (inérita) de que las células cultivadas con aminoácidos marcados, tenían actividad de decarboxilasa errática y no reproducible después del tratamiento con tripsina.

Nuestros hallazgos, sin embargo, presentan el mismo imbricamiento en los resultados observados por otros autores(3,4). Si bien a concentraciones elevadas de sustrato (0.9 y 1.8 mM) los resultados parecen discriminar bastante bien entre controles y mutantes heterocigotos, el número insuficiente de controles usados a estas concentraciones no permite llegar a conclusiones válidas.

Llama la atención el hecho de que la ADCA en los fibroblastos de origen paterno fue siempre mas baja que en los fibroblastos de origen materno. Elsas(5) también ha señalado disímil ADCA entre heterocigotos obligatorios de una misma familia por él estudiados. Alteraciones del sitio activo de la enzima dando origen a Km anormales, tal como en la situación descrita por Tedesco y Mellman en citrulinemia, pudieran ser responsables de este comportamiento(10).

Nuestros resultados señalan, por otro lado, que la tasa de decarboxilación de leucina-1-C¹⁴ aumenta en razón directa a la concentración de substrato utilizada, aunque el aumento no es tan conspicuo en la línea celular paterna. Se ha señalado que ésta sigue aumentando hasta por lo menos 20 mM(5).

Es notable además, en nuestros datos, que la ADCA fue superior en las células amnióticas controles que en los fibroblastos obtenidos por biopsia cutánea para la misma concentración de substrato (0.9 mM); y que la ADCA medida en los leucocitos y fibroblastos del propósito fue indistinguible de la de los controles.

Los resultados son evidentemente contradictorios con los obtenidos en el estudio prenatal en el cual se observaron diferencias significativas entre la ADCA de las células amnióticas obtenidas de la madre en estudio y la de los controles.

Explicaciones para este hecho serían meramente especulativas en estos momentos:

Kaback y Leonard, basados probablemente en fenómenos conocidos de inducción enzimática (Ej: glucoroniltransferasa) que ocurren al nacimiento, han propuesto un modelo teórico que representa las posibilidades de fenómenos de inducción y represión enzimática a distintas épocas del período pre y postnatal(7). Fenómenos represores de la ADCA en células amnióticas provenientes de madres heterocigotas pudieran explicar lo observado.

Por otro lado es conocido el hecho de que los cultivos de células amnióticas se pueden presentar en tres formas principales de acuerdo a la morfología celular, a saber: epiteloides, fibroblastoides y mixtas. Nadler (mencionado por Kaback) ha sugerido que varias enzimas glicolíticas pueden tener diferente grado de actividad en los diferentes tipos de cultivos(7). Nuestros cultivos tenían aspecto predominantemente fibroblastoide pero no se hizo especial hincapié en determinar esta variable.

Finalmente es posible, aunque improbable, que hayamos determinado ADCA en células de origen materno y no fetal.

Nosotros concluimos que en la cetonuria de cadena ramificada la detección del estado heterocigoto es difícil, dada la heterogeneidad fenotípica y genética de la enfermedad. Los resultados sugestivos de tal hecho deberán mirarse con cautela y se debe determinar si éstos no están influenciados por condiciones de cultivo, diferencias en los tipos morfoló-

gicos de los mismos o factores hasta la fecha poco entendidos. Futuras investigaciones en este campo aclararán las dudas presentes. Además, y aunque nuestros resultados no son concluyentes, queremos llamar la atención sobre la posible influencia de la concentración de sustrato como factor discriminante entre distintas líneas celulares. El uso de un sistema de células adheridas a su superficie de crecimiento no parece mejorar tal factor discriminante, por lo menos a concentraciones bajas de sustrato, cuando comparamos nuestros resultados con los de otros autores; pero por razones de facilidad metodológica y rapidez en la obtención de los resultados, la cual es crítica en diagnóstico prenatal, recomendamos esta última técnica.

SUMMARY

"Prenatal Diagnosis of Branched Chain Ketonuria".

Humberto Moreno Fuenmayor (Unidad de Genética Médica. Hospital Universitario, Maracaibo, Venezuela). Invest Clín. 16(1): 16-28, 1975. Skin fibroblasts and amniotic cells were cultivated in vials of those used for liquid scintillation counting. The cells grew until achieving complete confluence, and then the activity of ketoacid decarboxilase was determined by the radioisotopic dilution method without dettaching the cells from the glass wall. The method can be used even with 2×10^5 cells.

The enzyme activity was tested in fibroblasts obtained from patients with genetic disorders different from the disease in study. In the same manner enzymatic activity was also studied in amniotic cells obtained at the 16th of pregnancy from seven normal controls and from the mother under observation and besides, in fibroblasts and leukocytes of the girs product of the pregnancy. Results were obtained which pointed to a heterozygous fetus, thus the pregnancy was allowed to continue to term. However, post natal studies could not confirm these results.

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Venezuela por el aporte económico para la realización de este trabajo. A los doctores W.J. Mellman, M.D. y T. Tedesco Ph.D. por su inestimable ayuda en la planificación y crítica del mismo. A B. Needelmann, G. Jackson y H. Boedeker por la ayuda técnica en la preparación de los cultivos celulares y a los doctores R. Swartz y M. Mennutti por proveerme con las muestras de líquido amniótico necesarias para la realización del mismo.

- 12- SNYDERMAN SE, NORTON PM, ROITMAN E, HOLT LS: Maple Syrup Urine Disease with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34: 454-472, 1964.
 - 13- SCRIVER CR, MACKENZIE S, CLOW CL, DELVIN E: Thiamine responsive maple syrup urine disease. *The Lancet* I: 310-312, 1971.
 - 14- WENDEL U, WOHLER W, GOEDDE HW, LANENBECK U, PASSERGE E, RUDIGER HW: Rapid diagnosis of maple syrup urine disease (branched chain ketoaciduria) by micro-enzyme assay in leukocytes and fibroblasts. *Clin Chem Acta* 45: 433-440, 1973.
-

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- COHEN PP: En *Manometric Techniques* (Unbreit WW, Burris RH, Stauffer JF, eds), pp 147-150. Burgess, Minneapolis, Minnesota, 1957.
- 2- CORRIEL LL: Amniocentesis (Section II, Chap 7) en *Tissue Culture Methods and Applications* (Kruse PF y Patterson MK, eds) Academic Press New York, 1973.
- 3- DANCIS J, HUTZLER J, COX RP: Evaluation of amino acid metabolism in Maple Syrup Urine Disease (Section XIII, Chap 6) en *Tissue Culture Methods and Applications* (Kruse PF, y Patterson MK, eds), Academic Press, New York, 1973.
- 4- DANCIS J, HUTZLER J, SNYDERMAN SE, COX RP: Enzyme activity in various forms of Maple Syrup Urine Disease. *J Pediat* 81: 312-320, 1972.
- 5- ELSAS LJ, PASK BA, WHEELER FB, PERL DP, TRUSLER S: Classical Maple Syrup Urine Disease: Cofactor Resistance. *Metabolism* 21: 929-444, 1972.
- 6- GOEDDE HW, KELLER W: Metabolic pathways in Maple Syrup Urine Disease (Chap 11) en *Aminoacid Metabolism and Genetic Variation* (WL Nyham, ed) McGraw-Hill Book Company, New York, 1967.
- 7- KABACK MM, LEONARD CD: Morphological and enzymological considerations (Chap 8) en *Antenatal Diagnosis* (Albert Dorfman, ed), The University of Chicago Press, 1972.
- 8- LOWRY OH, ROSEBROUHG NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 9- LYONS LB, COX RP, DANCIS J: Complementation analysis of Maple Syrup Urine Disease in Heterokaryons derived from cultured human fibroblasts. *Nature* 243: 533-535, 1973.
- 10- MELLMAN WJ, KOHN G: Cultivos de células humanas, su empleo en investigaciones y en diagnóstico de estados patológicos. *Clin Med NA*, pp 705, 1970.
- 11- MENKES JH, HURST PL, CRAIG JH: A new syndrome: Progressive familiar cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14: 462,466. 1954.