Estudio analítico de la sero-reacción de precipitación con ácido sulfúrico

Por los Dres.

JUAN ANTONIO TABANERA, FERNANDO MODERN y GUILLERMO RUFF

De acuerdo con lo solicitado oportunamente al Prof. Dr. Sordelli por los Dres. Prof. Raúl F. Vaccarezza y Juan A. Tabanera, se han llevado a cabo, en el Instituto Bacteriológico Nacional una serie de pruebas químicas y físico-químicas tendientes a aclarar el mecanismo de una nueva sero-reacción propuesta por uno de nosotros (Tabanera).

Consiste la mencionada sero-reacción en la acción ejercida por una dilución de ácido sulfúrico pro-análisis d: 1,84 (25 cm^3 de ácido en 275 cm^3 de agua bidestilada) sobre 0,2 cm^3 de suero humano, extraído bajo condiciones especiales (con jeringa esterilizada a seco, paciente en ayunas). No debe presentar el mencionado suero ninguna señal de hemólisis.

Bajo estas condiciones y luego de hacer la mezcla, se observan los resultados al cabo de 20 a 24 horas, siempre que la temperatura no sea inferior a 18° ni mayor de 22°C.

Normalmente, se observa la formación de un precipitado el cual, en ciertos casos, aparece muy precozmente (entre la 6ª y 8ª hora) mientras que en otros se hace evidente recién a las 20-24 horas.

Los sujetos normales y los pacientes de ciertas enfermedades presentan siempre el precipitado descripto.

Pero el autor de la reacción ha observado que en determinadas condiciones, sobre todo en afecciones que alteran grandemente el equilibrio biológico del sujeto, no se forma el precipitado en el tiempo fijado, requiriendo —en caso de formarse— más de 120 horas.

La observación de este hecho, su repetición bajo condiciones determinadas, la constancia de su presencia en ciertas enfermedades, su carácter « inespecífico » con respecto a la etiología y su variación de acuerdo a la evolución de una entidad mórbida ha motivado

que los autores de la presente comunicación se abocaran al estudio de los fundamentos físico-químicos de la mencionada reacción, conforme a un plan trazado previa y conjuntamente con los Profesores Sordelli, Deulofeu y Vaccarezza.

1. — ESTUDIO DEL PRECIPITADO

A los efectos de conocer la naturaleza del precipitado que se obtiene normalmente mediante la sero-reacción se procedió a realizar las reacciones coloreadas para identificación de aminoácidos.

La técnica seguida para hacer las reacciones coloreadas que más adelante se describen, fué la siguiente:

El precipitado obtenido de sueros normales, siguiendo la técnica de uno de nosotros (Tabanera), fué sometido a cuatro lavados con agua destilada, se le agregó PO_4HNa_2 M/15 (Fosfato di-sódico) llevándolo potenciométricamente a pH 7,1 con Na.OH al 10 %. Con el precipitado así disuelto se realizaron las reacciones siguientes:

Reacción del Biuret	positiva	
» » Millon	»	
» » Hopkins-Cole	»	
» » Nitroprusiato	»	
» » Molisch	»	débil

Vistos los resultados obtenidos con las reacciones coloreadas, decidimos continuar nuestra labor con el fin de determinar la causa de esta reacción.

2. — DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO DEL PRECIPITADO

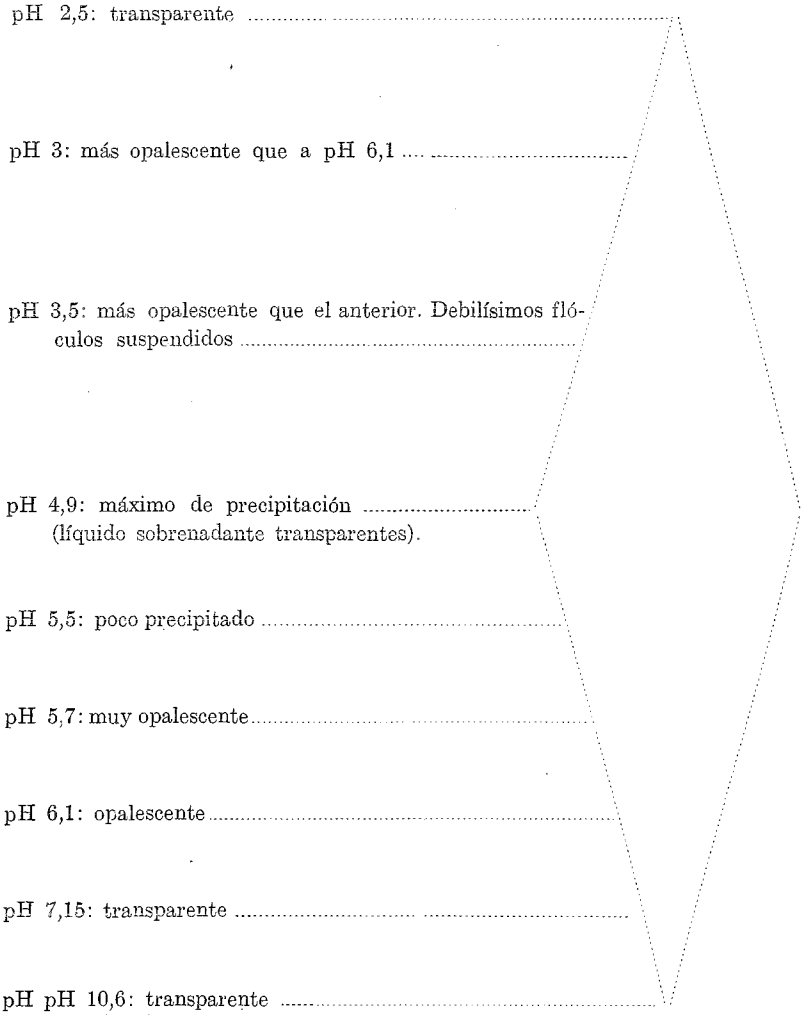
En primer término practicamos ensayos como exploración para tener una noción aproximada de la zona que debemos estudiar. Ellos no indicaron que estaba alrededor de pH 5. Procedimos en consecuencia a repurificar el precipitado lavado mediante 3 precipitaciones a pH 5, redisolviéndolo cada vez. La muestra final contenía 0,934 % de proteínas (ensayo gravimétrico). (Se descontó del extracto el Na.OH agregado para la redisolución final). A 30 cm^3 de esta solución le agregamos 0,5162 gramos de fosfato disódico Soerensen y apareció un débil tinte opalescente. Procedemos luego a la determinación del punto isoeléctrico de esta muestra. Con este fin se utilizó: ácido sulfúrico N, N/10, o Na.OH según los casos. Potenciométricamente, con electrodos de vidrio, determinamos la concentración del ión H.

El líquido con la substancia disuelta y la mezcla buffer se llevó después del agregado del ácido o de la soda a 4 cm^3 con agua des-

tilada. La concentración proteica en todos los tubos era la misma. La zona estudiada estaba comprendida entre los siguientes pH: 2,5; 3; 3,5; 4; 4,3; 4,9; 5,5; 5,7; 6,1; 7,15; 10,6. A cada tubo se le agregó 0,5 cm^3 de alcohol a 96°, cantidad suficiente para dar una debilísima opalescencia en el primer tubo.

Los primeros tubos que floculan son: el nº 4, el 5 y el 6 los que corresponden a los pH: 4; pH 4,3 y pH 4,9. Más tarde flocula el correspondiente a pH 5.

De acuerdo con este ensayo la zona isoeléctrica está comprendida entre pH 4 y pH 5. Podemos decir que la zona óptima de floculación está alrededor de pH 5 que, de acuerdo a estos ensayos, esta



substancia estaría comprendida dentro de la definición de globulinas (insoluble en agua). Esta substancia proteica se solubiliza en álcalis y en ácidos, siendo estable su solución a un pH menor de 3 y mayor de 6.

En el cuadro adjunto puede apreciarse mejor la floculación de la substancia.

3. — DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN NITRÓGENO/EXTRACTO SECO DEL PRECIPITADO

Obtenido el precipitado de un suero normal, siguiendo la técnica de uno de los autores (Tabanera), este precipitado se lo reprecipita 3 veces a pH 5, se disuelve luego con Na.OH a pH 7,3.

Durante 3 a 4 días, en cámara fría, se lo sometió a una diálisis previa, hasta conductividad constante. Al cabo de ese tiempo el aspecto es opalescente. Seguidamente se pasa a electrodializar la solución del precipitado. Empleamos el aparato electrodializar modelo Pauli, con electrodos de plata y platino. (Anodo: platino; cátodo: plata). Casi inmediatamente se obtiene una apreciable cantidad de flóculos, los cuales se van depositando en el fondo del aparato.

La electrodiálisis se prolongó por espacio de 8 días, comenzando con una diferencia de potencial de 50 voltios, de manera que el amperaje nunca fué mayor de 20 a 30 miliamperios. Progresivamente se fué aumentando el voltaje hasta llegar a 220 voltios, de manera que pasaran menos de 5 miliamperios. En esta forma obtuvimos precipitado suspendido en agua que tenía una conductividad del orden del agua destilada (3×10^{-6} ohms-recíprocos, 20°C).

El precipitado disuelto nos dió un contenido nitrogenado de 0,14 % (Micro-Kjeldahl, triplicado). El extracto seco, obtenido en la forma habitual, hasta peso constante a 105°C, acusó la cifra de 0,934 %. El factor de conversión de nitrógeno a proteínas corresponde prácticamente a 6,25 que es el clásico valor conocido para las proteínas. Así el valor encontrado fué 0,934 % y el valor teórico: 0,875 %, diferencia que cae dentro del margen de error del método.

De acuerdo con estas comprobaciones podemos asegurar que el precipitado obtenido por la sero-reacción ya mencionada y motivo de este estudio, es de naturaleza proteica.

Por ácido tricloroacético a la concentración final de 2 % precipita el 92,5 % del nitrógeno, quedando sin precipitar el 7,5 %. Esto nos indica que esta substancia proteica obtenida por la precipitación con el ácido sulfúrico, está parcialmente desnaturalizada.

4. — ENSAYOS SOBRE SUERO ELECTRODIALIZADO

Un suero clasificado como « normal » se diluye al 50 % con agua destilada, y luego se lo somete a una electrodiálisis prolongada.

Comenzamos con una diferencia de potencial de 50 voltios terminando con 220 voltios y hasta tanto nos diera una conductividad eléctrica constante. Durante la electrodiálisis precipitaron más del 90 % de las globulinas totales. (Ver trabajo de los Dres. Wernicke y Modern (Rev. Inst. Bact. 1926, tomo 14, pág. 441). El volumen final era el mismo que el inicial. Se procedió a realizar la reacción con ácido sulfúrico haciendo un estudio comparativo con el suero inicial. Los resultados obtenidos fueron:

Suero electrodializado:

Tubo número	1	2	3	4	5	6
Suero normal	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Reactivo ácido	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Lectura a las 24 horas	θ	θ	θ	θ	θ	θ

Suero sin electrodializar:

Tubo número	1	2	3	4	5	6
Suero normal	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Reactivo ácido	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Lectura a las 24 hs.	θ	*d*	*n*	++	++	++

Comentario: Este ensayo nos indica una vez más que el precipitado es una globulina que se separa fácilmente por electrodiálisis.

5. — ESTUDIO DE LA REACCIÓN CON LAS FRACCIONES PROTEICAS

Preparación del suero: Se agrega a 100 cm^3 de un suero normal (sero-reacción negativa), 200 cm^3 de solución fisiológica. De esta dilución 1 cm^3 contiene: 5,44 miligramos de nitrógeno.

Se agrega a 296 cm^3 de la solución primera: 40 gramos de sulfato de sodio seco y anhidro ($SO_4.Na_2$) (13,5 %). Se disuelve a 40°C, dejándolo reposar tres horas y filtrando luego. Precipita la fracción llamada « euglobulínica » y determinamos en el filtrado el nitrógeno que corresponde a la « seudoglobulina y albúmina ». 1 cm^3 de este filtrado contiene 3,865 miligramos de nitrógeno.

A este filtrado, en volumen total de 270 cm^3, se le agregan 23

gramos de sulfato de sodio para llevarlo a la concentración de 22,2 % en que precipitan las seudoglobulinas. Se deja en la estufa a 37°C durante 20 horas y se filtra.

El filtrado contiene 3,11 grs de nitrógeno y que corresponde a la fracción albumínica.

Las fracciones: euglobulina y seudoglobulina se dializan en sacos de celofán en cámara fría, hasta tanto el agua de diálisis de reacción negativa para sulfatos.

El fraccionamiento de un suero clasificado como « positivo » hecho en forma idéntica al anterior, dió los siguientes resultados: 1 cm³ de la dilución previa contenía 3,815 miligramos de nitrógeno. Después de precipitar las euglobulinas el filtrado contenía: 3,01 miligramos de nitrógeno. El filtrado correspondiente a las albúminas después de precipitar las seudoglobulinas, contenía: 1,82 miligramos de nitrógeno por centímetro cúbico.

El suero « positivo » contiene una mayor proporción de seudoglobulina. Las euglobulinas normales dan la reacción con el ácido sulfúrico más intensamente (ver capítulo siguiente).

La seudoglobulina es la fracción protectora de la reacción y se encuentra en una proporción muy superior en los sueros positivos. (Ver más adelante lo que se refiere a la prueba con la caseína y al poder protector).

Las fracciones proteicas, euglobulina normal y euglobulina positiva correspondiente a reacción « positiva » se llevó a la misma concentración nitrogenada. Lo mismo se hizo con la seudoglobulina normal y la positiva.

En estas fracciones se hace la reacción de precipitación comenzando con la euglobulina positiva y normal. La concentración era en las dos de: 3,780 miligramos de nitrógeno por cm³.

Con el objeto de dar mayor claridad a los resultados y facilitar así su lectura, comparación y clasificación, hemos adoptado los signos convencionales que se mencionan a continuación:

θ: nada o transparente; *d*: debilísima opalescencia; *n*: opalescencia nítida; *O*: muy opalescente; +: débil precipitado; ++: regular precipitado; +++: bastante precipitado; ++++: precipitado muy abundante.

1º *Euglobulina normal*:

Tubo número	1	2	3	4	5
Euglobulina normal	0,20	0,15	0,10	0,05	0,025
Agua destilada	—	0,05	0,10	0,15	0,175
Lectura a las 24 horas	+++	+++	++	*d*	θ

2º *Euglobulina positiva*:

Tubo número	1	2	3	4	5
Euglobulina positiva	0,20	0,15	0,10	0,05	0,025
Agua destilada	—	0,05	0,10	0,15	0,175
Lectura a las 24 horas	+++	++	*n*	*d*	θ

NOTA: En las siguientes experiencias se suprime la cantidad de agua destilada agregada a cada tubo en vista de que los volúmenes usados no tienen influencia en la reacción.

Comentario de las reacciones anteriores: Prácticamente entre la euglobulina normal y la euglobulina positiva no se nota diferencia con respecto al comportamiento de ambas frente a la dilución de ácido sulfúrico. La euglobulina positiva precipita hasta en concentraciones de 0,15 cm³ y la euglobulina normal hasta de 0,10 cm³.

3º *Seudoglobulina normal* (Concentración proteica: 4,20 mgrs de N por cm³):

Tubo número	1	2	3	4	5
Seudoglobulina normal	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Lectura a las 24 horas	*d*	*n*	0	0	0

4º *Seudoglobulina positiva* (Concentración proteica: 4,20 mgrs de N por cm³):

Tubo número	1	2	3	4	5
Seudoglobulina positiva	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Lectura a las 24 horas	θ	θ	*d*	*d*	*n*

Comentario: La seudoglobulina positiva no precipita en las concentraciones estudiadas y hasta en concentraciones de 0,20 cm³ queda completamente límpido el líquido a las 24 horas. En cambio la seudoglobulina normal no llega a precipitar en las concentraciones estudiadas, pero todos los tubos presentaron un aspecto muy opalescente.

5º *Albúmina normal* (Concentración proteica 6,05 mgrs de N por cm³):

Tubo número	1	2	3	4	5
Albúmina normal	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Lectura a las 24 horas	θ	θ	θ	*n*	0

6º *Albúmina positiva* (igual concentración que la anterior):

Tubo número	1	2	3	4	5
Albúmina positiva	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Lectura a las 24 horas	θ	θ	θ	θ	*d*

Comentario: La albúmina normal en concentraciones de 0,40 a 0,50 cm³, sin llegar a precipitar, da una opalescencia bien nítida, en cambio la albúmina positiva sólo da en el último tubo una debilísima opalescencia a las 24 horas.

MEZCLAS ENTRE SUERO Y LAS DIVERSAS FRACCIONES PROTEICAS

Se estudia a continuación el comportamiento del reactivo ácido frente a la unión suero-fracción proteica.

1º *Suero normal y seudoglobulina normal*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Suero normal	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Seudoglobulina normal	0,50	0,40	0,30	0,20	0,15	0,10	0,05
Lectura a las 24 horas	+	+	+	+	++++	++++	++++

2º *Suero normal y seudoglobulina positiva*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Suero normal	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Seudoglob. positiva ..	0,50	0,40	0,30	0,20	0,15	0,10	0,05
Lectura a las 24 horas	0	0	0	0	0	0	+

El suero normal y la seudoglobulina normal precipitan en todas las concentraciones que han sido estudiadas, el efecto protector de la seudoglobulina positiva sin embargo, impide la precipitación del suero hasta en la concentración de 0,10 cm³, dando solo una débil precipitación cuando la concentración de la seudoglobulina alcanza a 0,05 de cm³. La seudoglobulina normal tiene, no obstante, un cierto poder protector para con el suero, pero no alcanza nunca las cifras de la seudoglobulina positiva.

Estas experiencias nos demuestran en forma concluyente que la seudoglobulina normal no impide o impide muy poco la precipitación del suero. En cambio la seudoglobulina positiva denota un gran poder protector en todas las concentraciones estudiadas (exceptuando la concentración de 0,05 de cm³).

A continuación presentamos una serie de experiencias efectuadas con distintas mezclas, donde se pone de relieve la importancia de las efectuadas con el suero y la fracción seudoglobulina, sobre todo si se comparan sus resultados con los que se obtienen con los demás elementos del suero.

3º *Suero positivo y euglobulina normal*:

Tubo número	1	2	3	4	5
Suero positivo	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Euglobulina normal	0,00	0,20	0,15	0,10	0,05
Aspecto a las 24 horas	*n*	0	0	*n*	*n*

4º *Suero positivo y euglobulina positiva*:

Tubo número	1	2	3	4	5
Suero positivo	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Euglobulina positiva	0,00	0,20	0,15	0,10	0,05
Aspecto a las 24 horas	*n*	0	0	*n*	*n*

Comentario: El suero positivo y la euglobulina positiva no precipitan en ninguna de las concentraciones estudiadas. El suero positivo impide la precipitación de la euglobulina positiva (ver comportamiento de la euglobulina positiva aisladamente). El suero positivo impide también la precipitación de la euglobulina normal.

5º *Suero positivo y seudoglobulina normal*:

Tubo número	1	2	3
Suero positivo	0,20	0,20	0,20
Seudoglobulina normal	0,30	0,40	0,50
Lectura a las 24 horas	0	0	0

6º *Suero positivo y seudoglobulina positiva*:

Tubo número	1	2	3
Suero positivo	0,20	0,20	0,20
Seudoglobulina positiva	0,30	0,40	0,50
Aspecto a las 24 horas	*d*	*d*	*d*

Comentario: El suero positivo y la seudoglobulina positiva, como era de esperarse, no precipitan. El suero positivo tampoco precipita en presencia de la seudoglobulina normal, adquiriendo un aspecto más opalescente que el anterior.

7º *Suero normal y albúmina normal*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Suero normal	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Albúmina normal.	0,05	0,1	0,15	0,2	0,30	0,4	0,5
Lectura a las 24 hs.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

8º *Suero normal y albúmina positiva*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Suero normal	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Albúmina positiva	0,05	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5
Lectura a las 24 h.	++	+	0	0	0	0	0

Comentario: 0,15 cm³ de albúmina positiva impiden la precipitación del sucro normal, en cambio la albúmina normal no impide en ningún caso la acción del reactivo ácido (en las concentraciones estudiadas tanto de ácido sulfúrico como de albúmina y suero).

MEZCLA DE FRACCIONES PROTEICAS

1º *Euglobulina normal y seudoglobulina normal*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Euglobulina normal	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Seudoglobulina normal	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	—
Lectura a las 24 horas	+++	+++	+	0	0	0	0

2º *Euglobulina normal y seudoglobulina positiva*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Euglobulina normal	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Seudoglobulina positiva	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	—
Lectura a las 24 horas	++	0	0	0	0	0	0

Comentario: La euglobulina normal es más precipitante que la euglobulina positiva y necesita una concentración de 0,10 cm³ de seudoglobulina positiva para no precipitar; en cambio la seudoglobulina normal necesita una concentración de 0,30 cm³ para proteger a la euglobulina normal, es decir para evitar su precipitación por el reactivo ácido.

Podemos afirmar por lo tanto que la seudoglobulina positiva es más protectora que la seudoglobulina normal. Por otra parte, la euglobulina positiva es más precipitante que la euglobulina normal.

3º *Euglobulina positiva y seudoglobulina normal*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6
Euglobulina positiva	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Seudoglobulina normal	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Lectura a las 24 horas	+++	++	0	0	0	0

4º *Euglobulina positiva y seudoglobulina positiva*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6
Euglobulina positiva	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Seudoglobulina positiva	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Lectura a las 24 horas	0	0	*n*	*n*	*n*	*n*

Comentario: La seudoglobulina positiva protege a la euglobulina respecto a su precipitación con el r. ácido. El poder protector de la seudoglobulina positiva es mayor que el poder precipitante de la euglobulina positiva. (Para mayor claridad ver el cuadro de la euglobulina positiva). La precipitación de la euglobulina positiva se hace hasta en concentraciones de 0,10 cm^3 de seudoglobulina normal y sólo cantidades mayores de esta última substancia impiden la precipitación de la euglobulina positiva. Se aprecia, así, nuevamente que el poder protector de la seudoglobulina positiva es mayor que el de la seudoglobulina normal.

FRACCIONAMIENTO DE SUEROS NORMALES Y SUEROS POSITIVOS

Se estudió cuantitativamente el contenido nitrogenado de las fracciones proteicas constituídas por euglobulinas, seudoglobulinas y albúminas. La valoración del nitrógeno se hizo por micro-Kjeldhal por duplicado y las fracciones se investigan en el orden siguiente:

1º El contenido nitrogenado total del suero y que corresponde al nitrógeno de la *suma de euglobulinas + seudoglobulinas + albúminas*.

2º El nitrógeno correspondiente al filtrado obtenido después de la precipitación con $SO_4.Na_2$ en la concentración final del 13,5 % y que corresponde a la *suma de albúmina + seudoglobulinas* y,

3º El nitrógeno correspondiente a *las albúminas* y obtenido del filtrado después de precipitar las globulinas totales (euglobulinas + seudoglobulinas) con $SO_4.Na_2$ en la concentración final de 22,2 %. En esta forma se pudo conocer el contenido en albúminas, en euglobulinas y seudoglobulinas de los sueros normales y de los sueros positivos que figuran en el cuadro más adelante. Para evitar errores en las pesadas se emplearon dos soluciones de $SO_4.Na_2$ que conservamos en la estufa a 37°C, para evitar la cristalización de esta sal. La primera solución de $SO_4.Na_2$ con una concentración de 29,5 % de manera, que 1 parte de suero más 3 partes de esta solución diera una concentración final de 22,2 %, origina la precipitación de la euglobulina y de la seudoglobulina. La segunda solución a una concentración del 18 %: una parte de suero más

tres partes de $SO_4.Na_2$ daba una concentración final del 13,5 % y precipitaba la euglobulina.

En cada caso empleamos 5 cm³ de suero y 15 cm³ de la solución de $SO_4.Na_2$, dejando reposar esta mezcla en la estufa a 37°C durante 24 horas. Luego se filtró por papeles dobles valorando el nitrógeno por micro-Kjeldhal en los filtrados. Se estudiaron 7 sueros normales y 5 sueros positivos:

Sueros normales	N. en mgrs por cm³	Euglob. %	Seudoglob. %	Glob. totales	Albúminas %
1	13,02	15,32	16,93	32,25	67,74
2	14,14	12,87	17,82	30,69	69,30
3	14,00	14,00	17,00	31,00	69,00
4	12,60	11,11	20,00	31,11	68,89
5	11,90	10,59	17,65	28,24	71,76
6	12,60	10,00	18,88	28,88	71,11
7	13,02	12,91	19,35	32,26	67,74
Término medio ..	13,04	12,40	18,23	30,63	69,37
Sueros positivos					
1	11,24	21,10	31,19	52,29	47,71
2	11,20	10,00	35,00	45,00	55,00
3	12,60	15,55	23,33	38,88	61,11
4	13,58	14,43	27,83	42,26	57,73
5	11,20	25,00	25,00	50,00	50,00
Término medio ..	11,96	17,22	28,47	45,69	54,31

Se nota inmediatamente un notable aumento en la fracción seudoglobulínica que pasa de 18,23 % en los sueros normales a 28,47 % en los positivos (promedio aritmético). El contenido nitrogenado total es prácticamente el mismo en los sueros positivos y normales. Esto está corroborado con las determinaciones del índice de refracción que hicimos en 114 casos de sueros positivos y normales y que será objeto conjuntamente con otras observaciones físicas, de una comunicación posterior. La cantidad de albúminas en los sueros normales es superior a la de los sueros positivos. En los sueros normales el promedio es del 69 % del nitrógeno total y en los positivos el 54 %. También hay un aumento en la fracción euglobulínica en los sueros positivos.

Por lo tanto en los sueros estudiados por nosotros notamos un gran aumento en las globulinas totales (euglobulinas + seudoglobulinas).

Como la seudoglobulina es la fracción que impide la precipitación en la reacción que estudiamos, este aumento en los sueros positivos, nos explicaría la no precipitación. Sin embargo, puede ser alguna substancia que precipite con la seudoglobulina y que sea la causante de la no precipitación en los sueros positivos.

Por otra parte como demostramos en este trabajo, la seudoglobulina normal no impide la precipitación del suero (en la reacción de ácido sulfúrico) siendo en cambio la seudoglobulina positiva la que denota un gran poder protector y que impide la precipitación de las globulinas del suero positivo.

ENSAYOS DE PODER PROTECTOR DE LOS SUEROS SÓBRE OTRAS SUBSTANCIAS Y SOBRE OTROS SUEROS

Conjuntamente con los ensayos que se han presentado, uno de nosotros (Tabanera), ha efectuado algunas pruebas para poner en evidencia el poder protector de los sueros clasificados por él como « positivos » al mismo tiempo que destacar la diferencia neta que existe entre ellos con respecto a los « negativos ».

1º *Acción del reactivo ácido sobre la caseína sódica (Merck).* — Se prepara el indicador de caseína en la siguiente forma:

Se prepara una solución hidroalcohólica agregando a 75 cm³ de agua, 25 cm³ de alcohol de 90°. A esta solución se le agrega un exceso de caseína (más o menos 5 gr) y se hace hervir durante unos minutos, luego agitando fuertemente la solución. Iniciado el hervor del líquido, se retira del calor, se filtra al vacío en caliente y el líquido obtenido así, se lo envasa enviándose a esterilización en autoclave. El color que adquiere la solución es: marrón claro transparente (incipiente caramelización de la caseína).

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Solución de caseína ...	0,1	0,15	0,2	0,3	0,35	0,40	0,50
Reactivo ácido	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Lectura a las 24 hs. ...	+	++	++	++++	++++	++++	++++

Se aprecia de inmediato la intensa acción de la solución ácida sobre la caseína. La precipitación comienza a partir de la concentración 0,10, pues los pequeños fóculos suspendidos aparecen a los 60 minutos.

2º *Acción del reactivo ácido sobre la mezcla suero normal/caseína al 5 % aproximadamente*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Solución de caseína	0,1	0,15	0,2	0,3	0,35	0,4	0,5
Suero normal	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Reactivo ácido	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Lectura a las 24 hs.	+	++	+++	+++	+++	+++	+++

Por los resultados obtenidos aquí, se comprueba que la caseína en presencia de un suero normal precipita con la misma intensidad que estando sola a la concentración de 0,35 cm³.

Este experimento nos pone de manifiesto desde ya un ligero poder protector del suero normal, pero es de muy poca intensidad toda vez que a las 24 horas se han producido intensas precipitaciones en todos los tubos.

3º *La mezcla suero positivo/caseína al 5 % aproximadamente*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Suero positivo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Solución de caseína	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35
Reactivo ácido	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Lectura a las 24 horas	θ	θ	*d*	*d*	*d*	*n*	0

La comparación de estos resultados con los que se obtienen mediante la utilización de la solución de caseína aisladamente y de la misma en unión con el suero normal nos pone en evidencia en una forma categórica que existe en el suero positivo un poder protector de tal intensidad que es capaz de impedir la precipitación de la caseína hasta en la concentración de 0,35 cm³ para 0,1 cm³ de suero positivo.

4º *Acción del reactivo sobre la mezcla suero humano normal/suero normal de cerdo, inactivado a 56°C*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Suero humano normal	0,05	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5
» normal de cerdo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Reactivo ácido	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Lectura a las 24 hs.	++	++	++	+++	+++	+++	++++

5º *Mezcla de suero humano positivo/suero normal de cerdo inactivado*:

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7
Suero humano positivo	0,05	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5
» normal de cerdo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Reactivo ácido	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Lectura a las 24 horas	*n*	*n*	*d*	*d*	0	0	0

Por estos resultados es evidente que el poder de protección del suero positivo es lo suficiente como para impedir la precipitación del suero normal de cerdo, elemento éste que, de por sí, tiene una capacidad precipitante bastante manifiesta.

RESUMEN GENERAL

1º Se estudia químicamente el precipitado obtenido en la reacción del $SO_4.H_2$ sobre el suero normal y patológico. Como las reacciones de aminoácidos y proteínas obtenidas en el precipitado fueron positivas, se procedió a determinar el punto isoeléctrico de la substancia. Se comprobó que la zona de máxima precipitación en presencia de mezclas « buffer » se encontraba entre pH 4 y pH 5.

La relación entre el nitrógeno y el extracto seco del precipitado corresponde al factor de conversión del nitrógeno a proteínas (6,25).

Por electrodiálisis conseguimos precipitar cuantitativamente el mismo precipitado de la sero-reacción, pues el suero electrodializado no da más la « sero-reacción ». Este ensayo nos indica que el precipitado en su mayor parte corresponde a una globulina.

Al estudiar las fracciones proteicas en sueros positivos y normales se comprueba que la seudoglobulina normal no impide o impide muy poco la precipitación del suero, mientras la seudoglobulina positiva denota un gran poder protector en todas las concentraciones estudiadas.

En el estudio cuantitativo del fraccionamiento proteico de sueros normales y sueros positivos se nota un aumento en la fracción seudoglobulínica en los sueros positivos; también hay un aumento en las euglobulinas de los sueros positivos. Este aumento de la fracción seudoglobulínica en los sueros positivos nos explicaría la no precipitación. Sin embargo podría tratarse de alguna substancia que precipite con la seudoglobulina y que sea la causante de la no precipitación en los sueros positivos.

Finalmente en los ensayos hechos sobre otras substancias y sueros, se pone de manifiesto el poder protector del suero positivo frente a una solución coloidal de caseína.