Estudio de la suero-reacción de Tabanera

a) Influencia de los lípidos
b) Acción del ácido sulfúrico a diferentes concentraciones
c) Estudio nefelométrico de la reacción

por Fernando Modern, Juan Antonio Tabanera y Guillermo Ruff

La suero-reacción que estudiamos presentada por uno de nosotros en el año 1941, (1) fué motivo de estudios ulteriores tendientes a conocer el mecanismo de la reacción. Así fueron presentadas varias comunicaciones con los resultados que se iban obteniendo. Después de estudiar 1022 casos (2), llegamos a las siguientes conclusiones:

"El precipitado dió reacciones netas de proteínas y amino-ácidos; la relación entre el nitrógeno y el extracto seco del precipitado (3) correspondía al factor de conversión del nitrógeno a proteínas (6.25); por electrodiálisis se demostró que se trataba de una globulina y estudiando las fracciones proteicas de los sueros normales y patológicos se encontró que la seudoglobulina era el elemento "protector" que retardaba por un cierto tiempo la precipitación por el ácido sulfúrico de las otras fracciones, euglobulina y albúmina".

Esta fracción seudoglobulínica estaba aumentada sensiblemente en los sueros con reacción "positiva". Sin embargo, pusimos de relieve ya en esa oportunidad que bien podía tratarse de alguna otra substancia que precipitase conjuntamente con la seudoglobulina. A esta altura de la investigación decidimos asignar a la suero-reacción un valor numérico de sus resultados (4) con lo cual obteníamos una mayor exactitud de los mismos y permitió seguir la evolución de los casos estudiados clínicamente.

Se determinaron luego las curvas de los espectros de absorción (5) de los sueros positivos y negativos, así como también de las fracciones proteicas de los mismos, llegándose a la conclusión de que no existían diferencias apreciables, salvo las encontradas para la fracción albumínica, pero que no podían tomarse en cuenta por ser ellas pequeñas. Estudiamos después el índice de refracción (6) de los

---

Presentado en la reunión de comunicaciones del 16 de agosto de 1944.

sueros y hallamos valores muy diferentes para los positivos y los negativos, siendo el índice menor para los sueros positivos. En el mismo trabajo expusimos los resultados sobre conductividad, los que están de acuerdo con los valores hallados en la refractometría.

Resolvimos, entonces, encarar el problema desde otro punto de vista, cuyos resultados presentamos hoy en esta comunicación, la que será completada con el estudio posterior de las sales contenidas en los sueros.

a) *Influencia de los lípidos en la suero-reacción.*

De acuerdo con el plan de trabajo oportunamente trazado estudiamos la influencia que sobre el signo de la reacción pudieran tener los lípidos del suero. Para ello, a un suero con reacción positiva ++++, le eliminamos los lípidos en la siguiente forma:

Agregamos 25 cm^3 de alcohol absoluto (a — 15° C) a 3 cm^3 de suero y el total fué colocado a una temperatura de —15° C. Se agitó enérgicamente y se filtró por Gooch. En el mismo filtro, que contenía el suero deshidratado, agregamos 25 cm^3 de éter puro y enfriado (libre de peróxidos).

El suero así obtenido, libre de la mayor parte de los lípidos y llevado con agua al volumen inicial, dió con el ácido sulfúrico al 8,33 % aproximadamente, la misma reacción primitiva (positiva ++++).

Repetimos esta operación con dos sueros negativos y un suero positivo.

La reacción de precipitación en los sueros negativos (normales) se mantuvo aún después de eliminados los lípidos; en el suero positivo la reacción conservó también el mismo signo.

Teniendo en cuenta estos resultados, podemos descartar la influencia de los lípidos del suero en el signo de la suero-reacción de precipitación por el ácido sulfúrico.

Como dato complementario estudiamos la refractometría y polarimetría en los diferentes sueros llevados a igual concentración proteica que determinamos por el método Kjeldahl. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

a) *Refractometría de suero positivo* al 4 % y a 17.5° C. dió por resultado: N_D = 1, 34256.

b) *Refractometría de suero negativo* al 4 % y al 17,5° C. dió por resultado: N_D = 1, 34290.

c) *Polarimetría* a 20° C.
Suero positivo: — 2°,25.
Suero negativo: — 2°,40.

Esta desviación polarimétrica se determinó en tubos de 1 dm. de longitud empleando luz de sodio.

De acuerdo a los resultados anteriores podemos decir que, si llevamos un suero positivo o negativo a la misma concentración proteica final, los valores sufren muy pocas diferencias entre sí, los que sólo son imputables al margen de error del método.

b) *Acción del ácido sulfúrico a diferentes concentraciones.*

Todas estas experiencias fueron realizadas utilizando sueros positivos y negativos llevados previamente a una misma concentración proteica (4 %). La determinación del ion H se hizo potenciométricamente, utilizando un potenciómetro de Leeds y Northrup que da una aproximación de 0,02 de pH.

CUADRO 1 (SUERO NEGATIVO)

N.°	H_2SO_4	Prot. 4 %	H_2O	Concent. en H_2SO_4	A los 30 min.	pH	CH	Aspecto a 24 hs.
1	5 cm³. N	5 cm³.	0 cm³.	0.5	límpido	1.30	$5.02.10^{-2}$	débil opales.
2	2.5 cm³. N	«	2.5 cm³.	0.25	«	1.50	$3.16.10^{-2}$	claro
3	1.0 cm³. N	«	4.0 cm³.	0.10	«	1.65	$2.24.10^{-2}$	claro
4	5. cm³. N/10	«	0 cm³.	0.05	«	2.20	$6.29.10^{-3}$	claro
5	2.5 cm³. N/10	«	2.5 cm³.	0.025	opal. déb.	3.68	$2.09.10^{-4}$	claro
6	1.0 cm³. N/10	«	4.0 cm³.	0.01	opalesc.	5.3	$5.0 .10^{-6}$	precip. +
7	5 cm³. N/100	«	0 cm³.	0.005	men. opal.	6.3	$5.0 .10^{-7}$	precip. ½ +
8	2.5 cm³. N/100	«	2.5 cm³.	0.0025	«	6.9	$1.26.10^{-7}$	muy débil precipitado

CUADRO 2 (SUERO POSITIVO)

N.°	H_2SO_4	Prot. 4 %	H_2O	Concent. en H_2SO_4	A los 30 min.	pH	CH	Aspecto a 24 hs.
1	5 cm³. N	5 cm³.	0 cm³.	0.5	límpido	1.30	$5.02.10^{-2}$	opalescente
2	2.5 cm³. N	«	2.5 cm³.	0.25	«	1.42	$3.8 .10^{-2}$	claro
3	1.0 cm³. N	«	4 cm³.	0.10	«	1.70	$1.99.10^{-2}$	claro
4	5 cm³. N/10	«	0 cm³.	0.05	«	2.1	$7.91.10^{-3}$	claro
5	2.5 cm³. N/10	«	2.5 cm³.	0 025	opal. déb.	3.42	$3.80.10^{-4}$	opalescente
6	1.0 cm³. N/10	«	4 cm³.	0.01	flóculos	5.05	$8.91.10^{-6}$	precipit. ++++
7	5 cm³. N/100	«	0 cm³.	0.005	muy. opal débil flóculos	6.15	$7.08.10^{-7}$	precip. ++
8	2.5 cm³. N/100	«	2.5 cm³.	0.0025	muy. opal.	6.70	$1.99.10^{-7}$	prec. ½ +

El suero negativo a pH 5.3 presenta una opalescencia bien marcada a los 30 minutos y un precipitado (+) débil a las 24 horas; en cambio, en el suero positivo a pH 5.05 antes de los 30 minutos se observan flóculos que se depositan en el fondo del tubo. A las 24 horas presenta un gran precipitado (++++). Este mismo precipitado se obtiene también a pH 6.15 y pH 6.70. Llama la atención este comportamiento desde el momento que el suero positivo tiene proteínas que precipitan más fácilmente a esta concentración que el suero negativo. La cantidad de SO_4H_2 fijada por los dos sueros varía algo en los dos casos. El suero negativo fija cantidades mayo-

res de iones H que el suero positivo. La zona de precipitación máxima en los dos sueros es la misma con respecto al pH, aunque la cantidad sea mayor en los sueros positivos.

Estudiando la precipitación en la zona fuertemente ácida, pudimos comprobar la existencia de otra zona de precipitación que no tiene nada que ver con la ya estudiada anteriormente. Con este objeto hicimos las experiencias que exponemos a continuación:

CUADRO 3 (SUERO POSITIVO)

H_2SO_4	Prot. 4 %	Concent. final SO_4H_2	A los 30 minutos	Aspecto a 24 hs.
1 cm³. 2 N.	1 cm³.	1. n	opalescente	bien lechoso
1 cm³. 3 N.	1 cm³.	1.5 n	muy opalescente	bien lechoso
1 cm³. 4 N.	1 cm³.	2.0 n	muy opalescente	bien lechoso
1 cm³. 5 N.	1 cm³.	2.5 n	muy opalescente	bien lechoso

CUADRO 4 (SUERO NEGATIVO)

SO_4H_2	Prot. 4 %	Concent. final SO_4H_2	A los 30 minutos	Aspecto a 24 hs.
1 cm³. 2 N.	1 cm³.	1. N	apenas opalescente	muy opalescente
1 cm³. 3 N.	1 cm³.	1.5 N	más opalescente	muy opalescente
1 cm³. 4 N.	1 cm³.	2.0 N	precipitado abundante	precipitado separado en el fondo
1 cm³. 5 N.	1 cm³.	2.5 N	gelificado	flóculos suspendidos en la superficie.

Se ve por los cuadros anteriores que el suero negativo, cuando tiene una concentración 2N de SO_4H_2, da un precipitado a los 30 minutos de efectuada la mezcla; en cambio, el suero positivo no da precipitado en esta zona, como era de esperar.

Por lo tanto hemos encontrado dos zonas de precipitación en los sueros negativos y sólo una zona en los sueros positivos. Como suponíamos, en la suero-reacción que estudiamos (alta concentración de SO_4H_2) el pH final no tiene influencia en el signo, ya que se trata de cantidades muy grandes de ácido sulfúrico.

c) *Estudio nefelométrico de la reacción.*

Estudiamos la reacción de Tabanera con el fotómetro de Pulfrich para obtener las mediciones de enturbiamiento.

Empleamos vasos cilíndricos de 26 mm. de diámetro interior y, para contrastar el nefelómetro, un prisma de cristal turbio que se coloca en la cámara de agua en lugar del vaso. Usamos el filtro L_2 y el valor de nuestro prisma turbio era de 0.0096. Colocamos el tambor derecho en 100 y llamamos "a" al valor leído en el tambor izquierdo del nefelómetro. El enturbiamiento relativo está dado por la siguiente fórmula: enturb. relativo $= 100. \frac{100}{a}$

De este valor pasamos al enturbiamiento absoluto calculado de acuerdo a la siguiente fórmula: $\frac{T}{L}$ d. t. = enturb. absoluto.

T = enturbiamiento relativo de la emulsión.
L = enturbiamiento relativo del prisma, para las placas.
d = 1.0 (vaso de 26 mm. de diámetro).
t = constante de nuestra prisma (0.0096).

Así, pudimos calcular el valor correspondiente para cada una de las cuatro placas de nuestro nefelómetro. En cada caso utilizamos 0.2 c. c. de suero y 3 c. c. de ácido sulfúrico a la concentración del 10 %.

Se hace la observación inmediatamente y después cada diez minutos más o menos, hasta las tres horas en que la damos por terminada. La temperatura fué siempre constante: (20° C.).

Las constantes obtenidas con el prisma turbio y filtro L_2 para las placas 1, 2, 3 y 4 fueron las siguientes:

1º Cristal turbio.
2º Filtro: L_2.
3º t = 0.0096 (valor dado en el prisma).
4º T = 20° C.

Placa 1	Tambor derecho:	100		
	Tambor izquierdo:	6.0		Transp. rel.: = 1.667.
Placa 2	Tambor derecho:	100		
	Tambor izquierdo:	9.4		Transp. rel.: = 1.064.
Placa 3	Tambor derecho:	100	50	
	Tambor izquierdo:	9.0	45	Transp. rel.: = 111,1
Placa 4	Tambor derecho:	65		
	Tambor izquierdo:	100		Transp. rel.: = 65

Como nota aclaratoria, damos los valores obtenidos en un suero positivo (++++) y en uno negativo.

CUADRO 5 (SUERO POSITIVO)

Tiempo en minutos	Placa N.°	Valor leído en tambor izq. "a"	Valor recíproco Enturbiamiento relativo	Enturbiamiento absoluto
inmediato ..	3	7.5	133,3	11.5. 10^{-3}
1	1	4	2500	14.4. 10^{-3}
2	2	7	1428	12.8. 10^{-3}
10	3	39/39	256	22.1. 10^{-3}
11	4	67	149,2	22. 10^{-3}
11.5	1	—	—	—
12	2	4	2500	22.6. 10^{-3}
42	3	24	416,7	36.1. 10^{-3}
43	4	42/43	232,6	34.5. 10^{-3}
44	1	—	—	—
45	2	—	—	—
80	3	18/20/20	500	43.3. 10^{-3}
81	4	32/32/32	312	46.1. 10^{-3}
120	3	16/16/15.5	625	51.05.10^{-3}
121	4	26/26/26	384,6	56.8. 10^{-3}

CUADRO 6 (SUERO NEGATIVO)

Tiempo en minutos	Placa N.°	Valor leído en tambor izq. "a"	Valor recíproco Enturbiamiento relativo	Enturbiamiento absoluto
inmediato ..	3	57/56/55	178.6	15.5. 10^{-3}
1	4	72	138,9	20.5. 10^{-3}
2	1	3	3333	19.5. 10^{-3}
10	3	19/20/20	500	43.2. 10^{-3}
11	4	30/31/30/31	328,9	48.6. 10^{-3}
42	3	13/12/12	833,3	72.1. 10^{-3}
43	4	21/20/20	500	73.9. 10^{-3}
80	3	10/11/10	1000	86.5. 10^{-3}
81	4	15/16/16/17	625	91.3. 10^{-3}
120	3	8/8	1250	108.1. 10^{-3}
121	4	15/15/14/14	714,3	105.4. 10^{-3}

En los gráficos figuran 5 sueros negativos y 5 sueros positivos y, para no extendernos más, suprimimos los otros que prácticamente están comprendidos en los mismos valores, salvo raras excepciones que escapan a estas medidas.

Los gráficos son bien demostrativos, las diferencias son evidentes y el enturbiamiento absoluto, en los sueros negativos, llega hasta cerca de 100.10^{-3} unidades a los 120 minutos. En el mismo tiempo, los sueros positivos sólo llegan a un enturbiamiento absoluto de 70.10^{-3} unidades.

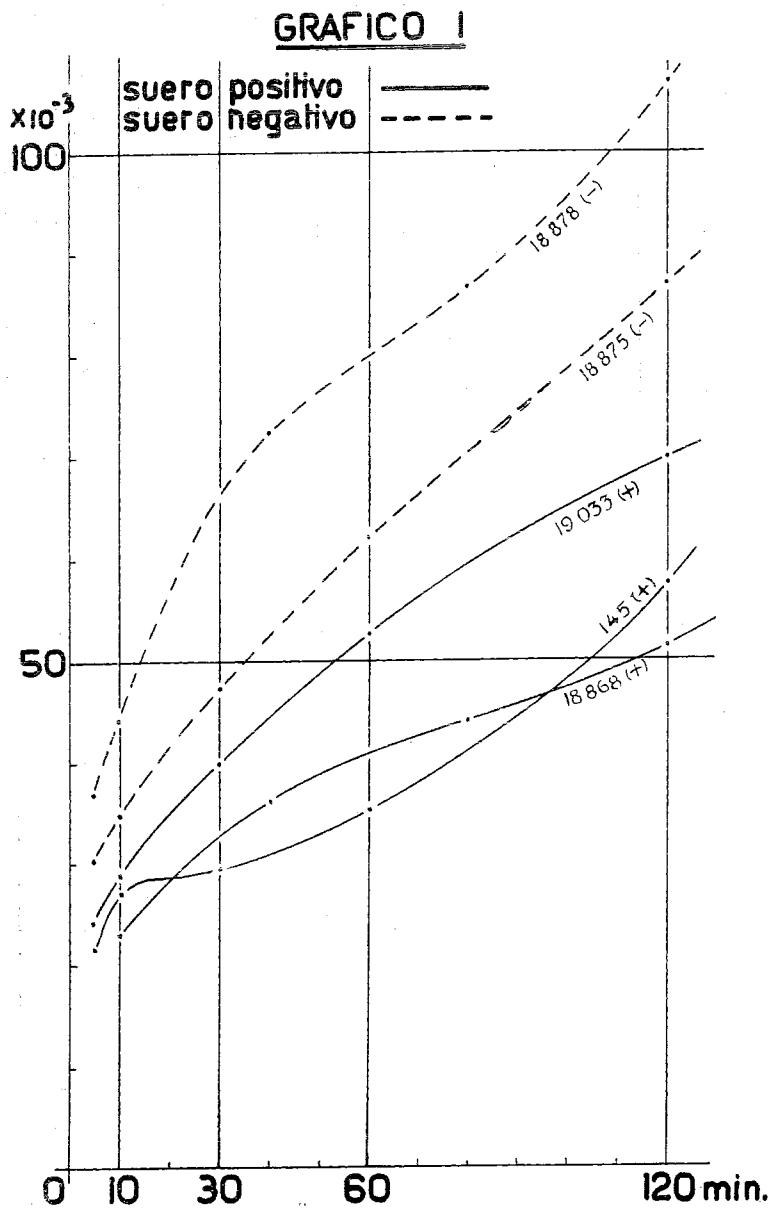
GRAFICO I
suero positivo
suero negativo
x10⁻³
100
50
0
10
30
60
120 min.
18 878 (−)
18 875 (−)
19 033 (+)
145 (+)
18 868 (+)

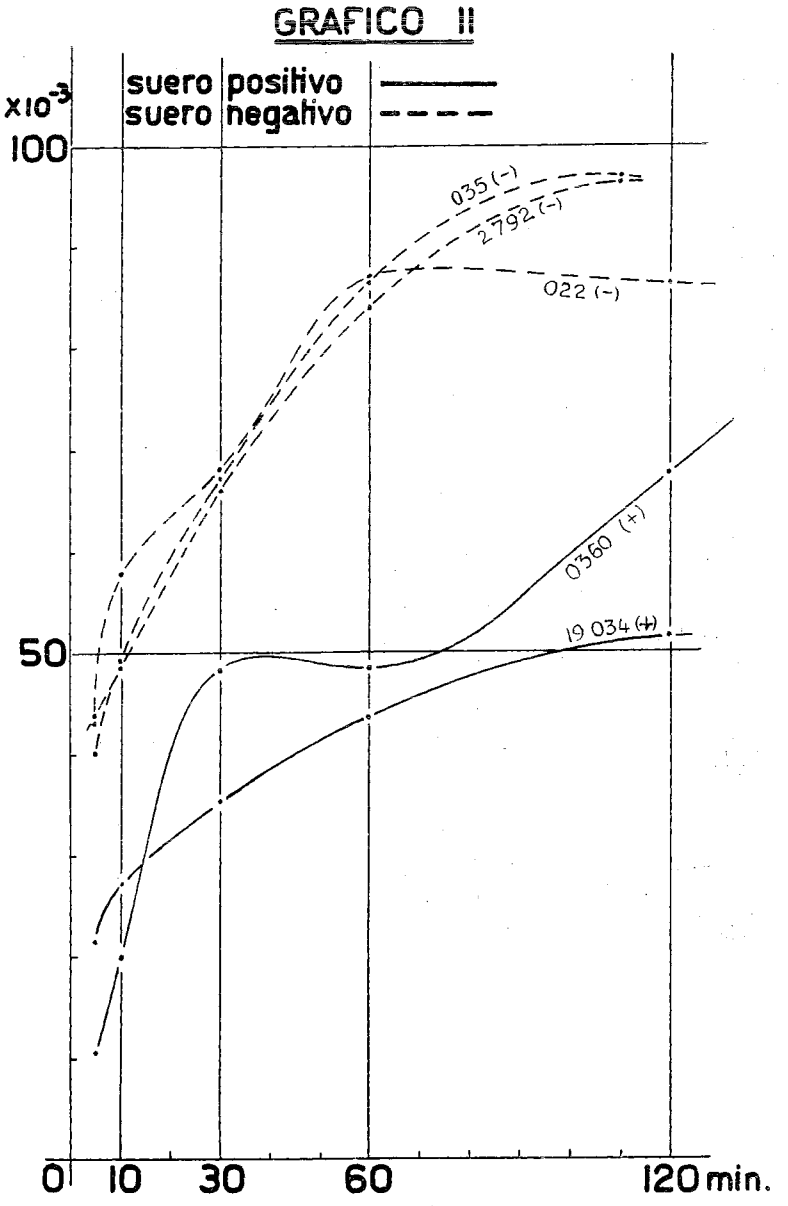
GRAFICO II
x10⁻³
suero positivo
suero negativo
100
50
035 (-)
2792 (-)
022 (-)
0360 (+)
19 034 (+)
0
10
30
60
120 min.

A los 60 minutos el enturbiamiento absoluto en los sueros negativos alcanzan valores de 85.10^{-3} unidades y sólo de más o menos 50.10^{-3} unidades en los sueros positivos. Estas diferencias tan marcadas ya se notan a los 10 minutos como se pueden ver en los gráficos.

Este método nefelométrico, por lo tanto, permite estudiar la reacción en forma precisa, dando valores numéricos y hace visible, en la mayor parte de los casos, el signo de la reacción ya antes de los 60 minutos.

RESUMEN

Del estudio realizado surgen como conclusiones las siguientes: Los lípidos no intervienen en el signo de la suero-reacción. El ácido sulfúrico a distintas concentraciones pone en evidencia diferencias bien netas entre los sueros positivos y negativos, dando para los primeros una sola zona de precipitación y dos para los sueros negativos.

Por nefelometría puede leerse rápidamente el signo de la reacción antes de los 60 minutos.

BIBLIOGRAFÍA

1. TABANERA, J. A. — "Nueva suero-reacción de precipitación". An. de la Cat. de pat. y clín. de la tub. 1941, **3**, 22.
2. TABANERA, J. A. — "Primeras comprobaciones clínicas de la suero-reacción de precipitación por el ácido sulfúrico". An. de la Cat. de pat. y clin. de la tub. 1941, **3**, 27.
3. Tabanera J. A. Modern F. y Ruff G. "Estudio físico-químico de la suero-reacción de precipitación por el ácido sulfúrico, primeras comprobaciones". An. de la Cat. de pat. y clin. de la tub. 1941, **3**, 238.
4. Tabanera J. A. y Palermo E. "Suero-reacción de precipitación por el ácido sulfúrico — nueva técnica". An. de la Cat. de pat. y clin. de la tub. 1942, **4**, 84.
5. Modern F. Tabanera J. A. y Ruff G. "Espectros de la absorción en la suero-reacción de precipitación por el ácido sulfúrico". An. de la Cat. de pat. y clin. de la tub. 1943, **5**.
6. Tabanera J. A. Modern F. "Estudio del índice de refracción en la suero-reacción de precipitación por el ácido sulfúrico". Soc. de Biología (en prensa).